

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR2005/003717

International filing date: 04 November 2005 (04.11.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0090000
Filing date: 05 November 2004 (05.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 13 January 2006 (13.01.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

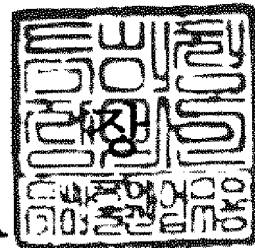
출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0090000 호
Application Number 10-2004-0090000

출 원 일 자 : 2004년 11월 05일
Date of Application NOV 05, 2004

출 원 인 : 김태윤 외 2 명
Applicant(s) KIM TAE YOON, et al

2006 년 01 월 13 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.11.05
【발명의 국문명칭】	C p G 올리고데옥시뉴클레오티드를 함유하는 피부질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물
【발명의 영문명칭】	Pharmaceutical composition for treating or preventing dermatitis comprising CpG oligodeoxynucleotide
【출원인】	
【성명】	김두식
【출원인코드】	4-1995-072479-3
【출원인】	
【성명】	권형주
【출원인코드】	4-2003-030898-1
【출원인】	
【성명】	김태윤
【출원인코드】	4-2000-001156-2
【대리인】	
【성명】	김석현
【대리인코드】	9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】	2004-077720-2
【포괄위임등록번호】	2004-077730-1
【포괄위임등록번호】	2002-072543-2
【발명자】	
【성명】	김두식
【출원인코드】	4-1995-072479-3
【발명자】	

【성명】 권형주
【출원인코드】 4-2003-030898-1

【발명자】

【성명】 김태윤
【출원인코드】 4-2000-001156-2

【발명자】

【성명의 국문표기】 김양순
【성명의 영문표기】 KIM, YANG SOON
【주민등록번호】 770122-2080711
【우편번호】 137-809
【주소】 서울시 서초구 반포1동 721-15호
【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 34
【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
김석현 (인)

【수수료】

【기본출원료】	0 면	38,000 원
【가산출원료】	57 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	6 항	301,000 원
【합계】		339,000 원
【감면사유】	개인(70%감면)	
【감면후 수수료】		101,700 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드의 치료학적 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드를 함유하는 피부질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 골격뿐 아니라 포스포디에스터 골격으로 변형되는 경우에도 피부질환에서 뛰어난 면역활성 효과를 나타낸다.

【대표도】

도 1

【색인어】

CpG 올리고데옥시뉴클레오티드, 피부질환

【명세서】

【발명의 명칭】

C p G 올리고데옥시뉴클레오티드를 함유하는 피부질환의 치료 또는 예방용
약학적 조성물{Pharmaceutical composition for treating or preventing
dermatitis comprising CpG oligodeoxynucleotide}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 IL-8 프로모터 및 IL-12 프로모터 활성화에 있어서, 본 발명에 따른 oligo-4 CpG ODN의 염기 변형에 따른 효과를 조사한 결과이다.
- <2> 도 2는 IL-8 프로모터 활성화에 있어서, 본 발명에 따른 oligo-4 CpG ODN의 골격 변형(backbone modification)에 따른 효과를 종래 CpG ODNs(1828 및 2006) 및 비(non)-CpG ODN(2041)과 비교 조사한 결과이다.
- <3> 대조군: 무처리
- <4> 도 3은 IL-12 p40(A) 및 IFN- γ (B)의 생산에 있어서, 본 발명에 따른 oligo-4 CpG ODN의 골격 변형에 따른 효과를 종래 CpG ODNs(1828 및 2006) 및 비-CpG ODN(2041)과 비교 조사한 결과이다.
- <5> 도 4는 대식세포에서의 염증 반응 관련 사이토카인들의 발현에 있어서, 본 발명에 따른 0형 oligo-4 CpG ODN의 효과를 종래의 0형 CpG ODNs(1828 및 2006)와 비교 조사한 결과이다.

<6> 도 5는 수지상 세포의 표면 분자들(MHC-II, CD80 및 CD86)의 활성화에 있어서, 본 발명의 0형 CpG ODNs의 효과를 조사한 결과이다.

<7> 대조군: 무처리

<8> LPS: 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide) 처리(양성 대조군)

<9> 도 6은 수지상 세포의 표면 분자들(CD80 및 CD86)의 활성화에 있어서, 본 발명의 0형 CpG ODNs의 효과를 농도별로 조사한 결과이다.

<10> 대조군: 무처리

<11> LPS: 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide) 처리(양성 대조군)

<12> 도 7은 수지상 세포에서의 IL-12의 발현에 있어서, 본 발명의 0형 oligo-4 CpG ODN의 효과를 종래의 0형 1826 CpG ODN과 비-CpG ODN(2041)과 비교 조사한 결과이다.

<13> 도 8은 동종(allogenic) T 림프구 증식에 있어서, 본 발명의 0형 CpG ODNs(oligo-4-11 및 oligo-4)의 효과를 조사한 결과이다.

<14> 도 9은 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)의 증식에 있어서, 본 발명의 0형 CpG ODNs(oligo-4-11 및 oligo-4)의 효과를 조사한 결과이다.

<15> 도 10은 FITC로 표지된 본 발명의 0형 oligo-4 CpG ODN이 NC/Nga 마우스의 등 표피내로 침투한 것을 관찰한 사진이다.

<16> 도 11은 본 발명에 따른 0형 oligo-4 CpG ODN의 투여에 의해 아토피 피부염이 치료되는 것을 동물 모델을 이용하여 확인한 결과이다.

- <17> A: 본 발명의 0형 oligo-4 CpG ODN을 NC/Nga 마우스의 등에 있는 아토피 피부염 병변에 도포한 후 5일 및 7일에 육안으로 관찰한 사진
- <18> B: 아토피 피부염이 발생한 NC/Nga 마우스의 등 피부에 0형 oligo-4 CpG-ODN을 도포한 후 피부를 적출하여 H&E 염색하여 관찰한 사진
- <19> ↔: 극세포증(acanthosis)
- <20> →: 과각화증(hyperkeratosis)
- <21> 도 12는 본 발명의 0형 oligo-4 CpG ODN을 투여한 NC/Nga 마우스의 등 피부에서 사이토카인(IL-4, IL-10 및 IFN- γ)의 발현을 관찰한 조직 화학적 분석 결과로서, 화살표는 사이토카인의 발현을 나타낸다.
- <22> 도 13은 본 발명의 0형 oligo-4 CpG ODN을 투여한 NC/Nga 마우스의 등 피부에서 치료 전후 침윤된 CD4+ 및 CD8+ 림프구를 관찰한 조직 화학적 분석 결과이다.
- <23> 도 14는 본 발명의 0형 oligo-4 CpG ODN을 투여한 후 NC/Nga 마우스의 혈청 내 IgE 수준을 조사한 결과이다.
- <24> AD: 무처리군

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <25> 본 발명은 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드의 치료학적 용도에 관한 것으로서,

보다 상세하게는 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드를 함유하는 피부질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.

<26> 피부질환은 사람을 포함하는 동물의 피부에서 나타나는 모든 이상소견을 말한다. 그 중에서도 아토피 피부염은 만성/염증성 피부질환으로서 심한 소양증, 건조한 피부 및 습진성 피부병변이 특징적인 주 증상이다(Rudikoff, D. *et al.*, *Lancet*. 351:1715-1721, 1998). 아토피 피부염은 일반적으로 유전적 경향이 있으며 개개인에 따라 알레르기 천식, 알레르기 비염, 알레르기 결막염 및 담마진 (urticaria)을 동반하기도 한다. 아토피 피부염 환자에서 보고된 일련의 면역학적 이상 소견으로는 IgE 생성의 증가, CD8+ 억제/세포독성 T 림프구 (suppressor/cytotoxic T lymphocytes) 수적 감소 및 기능 저하, IFN- γ 를 분비하는 Th1(T-cell Helper type 1) 림프구의 수적 감소 등이 있다. 또한 아토피 피부염은 조직학적으로 CD4+ 표현형을 갖는 T 림프구, 단핵구/대식 세포의 침윤, 비만 세포 및 호산구가 피부 병변에 증가되어 있으며, 수지상 세포(dendritic cells; DCs)와 표피의 랑게르한스 세포도 아토피 피부염의 피부 병변에서 증가되어 있다 (Imokawa, G., *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 96:523-526, 1991). 이와 같은 현상은 병변 부위가 아닌 정상 부위에서도 나타나는 것으로 조사되었다(Leung DY, Bhan AK, Schneeberger EE, Geha RS. *J Allergy Clin Immunol.*, 71(1 Pt 1), 47-56, 1983). 최근에 CCR4-발현 메모리(expressing memory) CD4+ T 림프구의 수가 아토피 피부염의 병변 부위에서 증가한다고 보고되었다(Imai, T. *et al.*, *Int.*

Immunol., 11:81-88, 1999). 또한 Van der Heijden FL 등은 병변내 침윤된 CD4+ 표현형을 갖는 T 림프구들이 주로 IL-4를 유리한다는 것을 보고했으며(Van der Heijden FL *et al.*, *J Invest Dermatol.*, 97:389-394, 1991), 이들 IL-4의 작용에 의해 항원 전달세포에서 면역글로불린 E에 대한 낮은 결합력 Fc 수용체(low-affinity Fc receptor)가 항진된다고 했다.

<27> 또한 T 림프구 및 이로부터 유리되는 여러 사이토카인들이 아토피 피부염의 면역 병리학적 발생기전과 밀접한 관계가 있다는 실험적 근거들이 최근에 보고되었다. 아토피 피부염 환자에서 IL-4, IL-5와 IL-10을 생성하는 알러젠-특이적 T 헬퍼 타입 2(allergen-specific T helper type2) 림프구들이 염증이 일어난 병변 부위에서 증가되며, 이것이 알레르기 반응과 IgE의 증가 모두에서 중요한 영향을 미친다고 보고되어 있다(hussain, I. *et al.*, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.*, 2:199-120, 2003). 또 다른 연구자들은 아토피 피부염과 관련된 케모카인과 그들의 수용체들이 피부장벽에서 중요한 역할을 하는 것을 조사하였다. 그 결과, 아토피 피부염 환자의 각질형성 세포로부터 많은 양의 TSLP(thymic stromal lymphopoietin)과 MDC(macrophage-derived chemokine)가 생성되며, IFN- γ 의 자극시 많은 양의 RANTES, TARC, MDC을 생성한다는 것을 보고하였다(Giustizieri, ML. *et al.*, *J. Allergy Clin Immunol.*, 107:871-877, 2001).

<28> 한편, 일반적으로 척추동물이 진화하는 과정에서 면역체계는 몇 종류의 특징적인 미생물의 분자들을 인식하여 미생물의 침입에 대하여 면역활성이 빠르게 일어

나도록 발달하였다. 여러 연구자들의 보고에 의하면 박테리아 DNA는 척추동물의 DNA에는 존재하지 않는 여러 가지 구조 결정인자가 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 이 인자들이 면역세포를 활성화시킨다고 알려졌다(Gillkeson, GS. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95:1398-1402, 1995). 척추동물과 박테리아 DNA의 특징적인 차이점은 척추동물의 유전체는 CpG가 억제되어 있고, 또한 CpG 모티프 디뉴클레오티드(dinucleotide)에서 시토신(cytosine)의 70%가 메틸화(methylation) 되어있다는 것이다(Krieg, AM. *et al.*, *Nature* 374:546-549, 1995). 비메틸화된 CpG 모티프들(unmethylated CpG motifs)은 박테리아에서 매우 흔하나, 포유동물에서는 그렇지 않다. CpG 모티프를 포함하는 올리고데옥시뉴클레오티드(oligodeoxynucleotide, ODN)는 선천적(innate) 면역 반응에서 획득된 면역 반응(acquired immune responses)에 이르는 숙주의 방어 기작을 활성화시킨다(Akdis, CA. *Curr Opin Immunol.*, 12:641-646, 2000). 일반적으로 CpG ODN은 B 세포와 NK 세포를 모두 활성화시킬 수 있다. 또한 CpG 서열은 NK 세포로부터 IFN- γ 생성의 잠재적인 유도체인 IL-12를 분비하기 위해 대식세포(macrophages)를 자극한다(Krieg, AM. *Annual Review Immunol.*, 20:709-760, 2002). 동시에, 이러한 세포는 IL-1, IL-6, IL-18 및 TNF와 같은 전-염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)과 IFN- γ 및 IL-12와 같은 Th1-biased 면역 환경을 만드는 사이토카인 또는 케모카인을 분비한다. 더욱이, CpG ODN은 IgG2a 아이소타입(isotypes)(Th1 type indicator)쪽으로 유도하는 체액성 반응(humoral responses)을 증진시키며, 증가된 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL) 활성화를 유도한다(Warren, TL. *et al.*, *J.*

Immunol., 165:6244-6251, 2000). 동물 모델에서 알레르기 현상과 암 치료를 위한 CpG ODN의 사용은 직접적이거나 간접적인 면역 반응 증진에 매우 효과적인 방법이다. 이러한 CpG ODN은 동일한 CpG 모티프를 가지고 있다고 하더라도 그 염기서열에 따라 다른 생리적 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

<29> 최근에는 CpG ODN의 유용성을 높이기 위하여 골격(backbone)을 변형시킨 CpG ODN이 개발되었다. DNA의 기본 골격인 포스포디에스터(phosphodiester) 골격의 CpG ODN은 뉴클레아제에 대해 민감한 편이어서 체내에서 빠르게 분해된다. 따라서 생체 내에서 독성을 유발할 위험이 적다. 그러나, 다른 골격의 CpG ODN에 비해 그 활성이 낮은 것으로 알려져 있다(Kwon, HJ. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311:129-138, 2003 Lee, KW. *et al.*, *Mol. Immunol.* 41:955-964, 2004). 이에 반해, 포스포로티오에이트 골격(phosphorothioate backbone)의 CpG ODN은 체내에서 뉴클레아제에 의해 분해되지 않도록 구조를 변경하여 인위적으로 만들어진 것이다. 포스포로티오에이트 골격의 CpG ODN은 포스포디에스터 골격의 CpG ODN에 비해 체내에서 안정하고 B 세포를 유도하는 능력이 더욱 뛰어나다. 따라서 현재 포스포로티오에이트 골격으로 변형시킨 CpG ODN이 가장 널리 사용되고 있다. 그러나, 이러한 포스포로티오에이트 골격의 CpG ODN은 수많은 단백질에 비특이적인 ODN의 결합을 증가시키며, 체 내에서 쉽게 분해되지 않기 때문에 독성을 유발한다. 또한 포스포로티오에이트 골격의 CpG ODN가 관절염(arthritis)의 유발 및 증상을 악화시키고(Deng GM *et al.*, *Arthritis & Rheumatism*, 43(2):356-364, 2000; Masayuki Miyata *et al.*, *Arthritis & Rheumatism*, 43(11):2578-2582, 2000),

SLE(systemic lupus erythematosus)와 같은 자가면역 질환을 일으킬 수 있다고 보고된 바 있다(Tanaka, T. *et al.*, *J Exp. Med.* 175:597-607, 1992; Hans-Joachim Anders *et al.*, *The FASEB Journal* express article 10. 1096/fj. 03-0646fje. published online January 20, 2004). 이외에도 포스포로티오에이트 골격을 가지는 CpG ODN의 부작용에 대하여 여러 연구자들이 보고하였다(Tsunoda I. *et al.*, *Brain Pathol.*, 9(3):481-493, 1999; Bachmaier K. *et al.*, *Science*, 283(5406):1335-1339, 1999).

<30> 이와 같이 이러한 CpG ODN은 현재 면역활성제로서의 용도에 대해서만 광범위하게 연구되어 있을 뿐, 피부질환의 치료 및 예방 효과에 대해서는 연구된 바 없으며, 특히 포스포디에스터 골격을 가지는 CpG ODN의 피부질환의 치료 및 예방 효과에 대하여 전혀 연구된 바 없다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<31> 따라서, 본 발명은 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드의 새로운 치료학적 용도를 제공한다.

【발명의 구성】

<32> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 일반식으로 표시되

고 적어도 2개 이상의 비메틸화된 CpG 모티프를 가지는 염기서열로 이루어진 분리된 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드를 유효성분으로 함유하는 피부질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

<33> [일반식]: SYSSACGTTSNYRAWMYTC(서열번호 1)

<34> 본 발명에서, 'CpG 모티프(motif)'라 함은 포스페이트 결합(phosphate bond)으로 연결된 비메틸화된 시토신-구아닌 디뉴클레오티드(unmethylated cytosine-guanine dinucleotide)(또는 'unmethylated cytosine-phosphate-guanine dinucleotide'라고도 함)를 함유하며 면역반응을 활성화시키는 염기서열을 말한다. 또한 'CpG 올리고데옥시뉴클레오티드(oligodeoxynucleotide, 이하 'CpG ODN'이라 함)'은 상기 CpG 모티프를 적어도 2개 이상 포함하는 올리고데옥시뉴클레오티드를 말한다.

<35> 본 발명자들은 피부질환의 치료 또는 예방에 있어서 CpG ODN의 효과를 연구하던 중, 하기의 일반식으로 표시되고 적어도 2개 이상의 비메틸화된 CpG 모티프를 함유하는 분리된 CpG ODN의 피부질환의 치료 또는 예방제로서의 용도를 처음으로 규명하였다.

<36> [일반식]: SYSSACGTTSNYRAWMYTC(서열번호 1)

<37> 여기에서, S는 G 또는 C이고 Y는 C 또는 T이고 N은 A, G, T 및 C로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고 R은 G 또는 A이고 W는 A 또는 T이고 및 M은 A 또는 C이다.

<38> 바람직하게는 상기 일반식에서 YS 또는 YR 디뉴클레오티드가 CG일 수 있다. 본 발명에 따른 CpG ODN은 서열번호 2 내지 서열번호 8로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것이 보다 바람직하다. 가장 바람직하게는 서열번호 2 또는 서열번호 8의 염기서열을 가질 수 있다.

<39> 본 발명의 CpG ODN은 천연 공급원(예: 대장균의 염색체 DNA)으로부터 유래될 수도 있으며, 화학적으로 합성되거나 제조합적으로 제조될 수 있다. 본 발명의 CpG ODN은 당업계에 공지된 다양한 핵산 합성 기술 및 기계를 이용하여 합성될 수 있다(Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Chs 2. and 4(Wiley Interscience, 1989; Maniatis, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab., New York, 1982); 미국 특허 제4,458,066호 및 미국 특허 제4,650,675호). 또한 제한효소, 엑소뉴클레아제 또는 엔도뉴클레아제를 이용하여 이미 존재하는 핵산 서열로부터 제조될 수도 있다.

<40> 본 발명의 CpG ODN은 포스포디에스터 골격을 갖는 것이 바람직하다. DNA의 기본 골격인 포스포디에스터 골격은 생체 내 뉴클레아제에 의해 쉽게 분해되기 때문에 독성을 유발할 위험이 적다. 본 발명의 CpG ODN은 포스포디에스터 골격이라 할지라도 종래 다른 CpG ODN과는 달리 시험관내뿐 아니라 생체내에서 뛰어난 면역 활성을 나타낸다는 특징이 있다. 또한 본 발명의 CpG ODN은 변형된골격(modified backbone)을 가질 수 있다. 올리고뉴클레오티드 골격의 변형은 생체 내에 투여될 때 CpG ODN의 활성 및/또는 안정성을 강화시킬 수 있음이 알려져 왔다. 본 발명의

CpG ODN에 있어서 바람직한 골격의 변형으로는 분해에 내성을 갖게 하는 포스포로티오에이트 변형을 포함한다. 포스포로티오에이트 변형은 말단에서 일어날 수 있으며, 예컨대 마지막 2개 또는 3개의 5' 또는 3' 뉴클레오티드가 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결될 수 있다. 또한 본 발명의 CpG ODN은 분해에 내성을 갖도록 하는 2차 구조(예: 스템 루프 구조)를 포함하도록 변형될 수 있다. 바람직하게는 하나 이상의 부분적 포스포로티오에이트 변형된 골격을 가지도록 변형될 수 있다. 포스포로티오에이트는 포스포르아미데이트 또는 H-포스포네이트 화학을 이용하여 자동화된 기술에 의해 합성될 수 있다(S. E. Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 22:1859, 1981; Connolly *et al.*, *Biochemistry*, 23:3443, 1984; Agrawal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7079-7083, 1988; Garegg *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 27:4051-4054, 1986; Froehler *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, 14:5399-5407, Garegg *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 29:2619-2622, 1988). 또 다른 변형인 아릴- 및 알킬- 포스포네이트는 예컨대 미국 특허 제4,469,863호에 기술된 바와 같이 제조될 수 있으며, 알킬포스포트리에스테르(하전된 산소 잔기가 미국 특허 제 5,023,243호 및 유럽 특허 제092,574호에 기술된 바와 같이 알킬화됨)가 시판 시약을 이용하여 자동화된 고체상 합성에 의해 제조될 수 있다. 또 분해에 덜 민감하도록 하는 또 다른 변형은 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민 및 우라실의 아세틸-, 티오- 및 이와 유사한 변형뿐 만 아니라 이노신 및 퀴신과 같은 비전형 염기를 포함하는 것이다. 테트라에틸글리콜 또는 헥사에틸렌글리콜과 같은 디올을 말단으로 포함하는 CpG ODN도 분해에 보다 내성적이다. 이외에도 포스포디에스테르와 포스포로

티오에이트의 조합, 포스포트리에스터, 포스포라미네이트, 메틸포스포네이트, 메틸 포스포로티오네이트, 포스포로디티로에이트 및 이들의 조합이 포함된다(Khorana *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 72:209, 1972; Reese, *Tetrahedron Lett.*, 33:3143-3179, 1978; Jaget *et al.*, *Biochemistry.*, 27:7237, 1988; Agrawal *et al.*, *Proc. Antl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7079-7083, 1988; Uhlmann, E. *et al.*, *Chem. Rev.*, 90:544, 1990; Goodchild, J. *Bioconjugate Chem.*, 4:165, 1990). 이와 같이 골격이 변형된 CpG ODN은 강화된 뉴클레아제 저항성(enhanced nuclease resistance), 증가된 세포 흡수(increased cellular uptake), 증가된 단백질 결합(increased protein uptake) 및/또는 변경된 세포내 위치화(altered intracellular localization) 등을 통해 더 강력한 면역효과를 보일 수 있다.

<41> 본 발명의 CpG ODN의 바람직한 골격은 포스포디에스터(이하, '0형'이라 함) 또는 포스포로티오에이트(이하, 'S형'이라 함) 골격이며, 가장 바람직한 골격은 생체 내에서 쉽게 분해되어 부작용을 유발하지 않는 0형 골격이다.

<42> 본 발명에 따른 CpG ODN은 Th2 사이토카인(예: IL-4, IL-10)을 억제하거나 또는/및 Th1 사이토카인(예: IL-12, IFN- γ)을 유도함으로써 Th1/Th2 면역반응의 평형(balance)을 조절하는 생리적 활성을 가진다. 상기와 같은 활성을 통해 본 발명에 따른 CpG ODN은 피부질환의 치료 또는 증상 개선의 효과를 나타낸다. 종래 알려진 CpG ODN과는 달리 본 발명의 CpG ODN은 골격의 형태에 관계없이 거의 동일한 활성을 나타낸다는 점에 특징이 있다. 그러므로 본 발명의 CpG ODN은 피부질환

의 치료 또는 예방에 효과적으로 사용될 수 있다.

<43> 본 발명에 적용될 수 있는 피부질환은 Th1/Th2 면역반응의 평형에 이상이 생겨 유발되는 질환, 즉 Th2-림프구에 의해 매개되는 사이토카인의 과발현 Th1-림프구에 의해 매개되는 사이토카인의 저발현 혈청내 IgE 수치의 증가 CD4+ 및 CD8+ 표현형 T 림프구의 수적 이상 및 기능적 이상 및 수지상 세포 및/또는 대식세포의 활성 저하로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상으로 인해 유발되는 피부질환일 수 있다. 특히 IL-12의 발현 저하로 인하여 유발되거나 IL-12의 발현 또는 생성을 증가시킴으로써 치료될 수 있는 피부질환일 수 있다.

<44> IL-12는 초기 감염에 대하여 생성되는 선천 면역(innate immunity)을 증폭시키는 기능을 할 뿐 아니라, 수지상 세포 및 대식세포를 포함하는 APCs(antigen presenting cells)와 T 세포와의 상호작용에 관여함으로써 보다 효과적인 획득 면역반응(adaptive immune response)을 유도하는데 매우 중요한 역할을 하고 있다. 수지상 세포나 대식세포와 같은 APCs로부터의 IL-12의 생성은 크게 T 세포 비의존적 기작과 T 세포 의존적 기작으로 나뉜다. T 세포 비의존적 기작은 바이러스나 박테리아를 포함하는 감염성 제제(infectious agents) 또는 그 생성물인 LPS나 박테리아 DNA에 의해서 유도되는데(D' Andrea A *et al.*, *J. Exp. Med.*, 176:1387, 1992; Sato T *et al.*, *Science*273:352-354, 1996), 이 기작은 선천 면역과 획득 면역을 연결시켜주는 매개체로서의 IL-12의 면역학적 중요성을 제시해준다. 또한 T 세포 의존적인 IL-12 생성 기작은 주로 CD40 리간드와 같은 분자를 통한 동시-자극적 신호(co-stimulatory signal)를 제공하는 활성화된 T 세포와의 상호작용을 통해

유도되는데(Shu U *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 25:1125-1128, 1995; Cella M *et al.*, *J. Exp. Med.*, 184:747-752, 1996), 이는 획득 면역 형성에 있어서 세포독성 T 세포 증식 및 세포독성의 증가나 Th1 면역반응의 지속적인 유지와 같은 T 세포 면역 반응을 유도하는데 IL-12가 중요한 역할을 함을 나타낸다. IL-12는 주로 APCs로부터 생성되는데, 수지상 세포나 대식세포에 직접 작용하여 IFN- γ 의 생성을 유도한다. 또한 IL-12는 활성화된 T 세포에도 작용할 수 있는데, T 세포로부터 IFN- γ 의 생성을 유도하며 IFN- γ 에 의해 유도되는 면역반응을 조절할 수 있다 (Chan SH *et al.*, *J. Exp. Med.*, 173:869-879, 1991).

<45> 이러한 IL-12가 다양한 질환과 관계있음이 알려져 있다. 그 예로는 아토피 피부염 및 알레르기 피부질환(Neumann C., *et al.*, *J Mol Med.*, 74: 401-406, 1996; Aiba S., *et al.*, *Exp Dermatol.*, 12: 86-95, 2003; nilsson C., *et al.*, *Clin Exp Allergy.*, 34: 373-380, 2004), 바이러스성 피부질환(Katakura, T., *et al.*, *Clin. Immunol.* 105:363-370, 2002 Hengge U. R., *et al.*, *Br. J. Dermatol.*, 149:15-19, 2003; Arany I., *et al.*, *Antiviral Res.*, 43: 55-63, 1999), 피부암 (Rook AH., *et al Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 795:310-318, 1996; Gollob, JA., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 21:2564-2573, 2003; Trinchieri G., *et al.*, *Annu Rev Immunol.*, 13: 251-276, 1995; Krepler C., *et al.*, *J invest Dermatol.*, 122: 387-391, 2004) 등이 있다.

<46> 따라서, 본 발명에 적용될 수 있는 피부질환은 바람직하게는 아토피 피부염, 알레르기 피부질환, 바이러스성 피부질환 및 피부암 치료에 적용될 수 있다. 가장

바람직하게는 아토피 피부염일 수 있다.

<47> 본 발명에 따른 CpG ODN은 개체에 직접 투여될 수 있다. 또한 표적 세포(예: 수지상 세포의 표면)에 대한 고친화성 결합을 유발하는 분자와 결합되거나 상기 분자 내에 캡슐화되어 핵산 전달 복합체(nucleic acid delivery complex)의 형태로 투여될 수도 있다. 본 발명의 CpG ODN은 당업계에 공지된 기술을 이용하여 이온결합 또는 공유결합을 통해 스테롤(예: 콜레스테롤), 지질(예: 양이온 지질, 비로솜 또는 리포솜) 또는 표적 세포 특이적 결합제(예: 표적세포 특이적 수용체에 의해 인지되는 리간드)와 결합될 수 있다. 적합한 커플링제 또는 가교제로는 예컨대 단백질 A, 카보디이미드, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오테이트(SPDP) 등을 수용할 수 있다.

<48> 본 발명에 따른 CpG ODN은 당업계에 공지된 방법(Donnelly *et al.*, *J. Imm. Methods.*, 176:145, 1994; Vitrello *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95:341, 1995)에 따라 다양한 경로로 투여될 수 있다. 즉, 경구 또는 비경구, 예컨대 구강, 근육내, 정맥내, 피내, 동맥내, 골수내, 경막내, 복강내, 비강내, 질내, 직장내, 설하 또는 피하 투여되거나, 위장관, 점막 또는 호흡기로 투여될 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따른 CpG ODN을 주사용 제형으로 제조하여 이를 30 게이지의 가는 주사 바늘로 피부 아래층에 일정량을 주입하거나 주사 바늘로 피부를 가볍게 단자(prick)하는 방법, 또는 피부에 직접적으로 도포하는 방법으로 투여될 수 있다.

<49> 또한 본 발명에 따른 CpG ODN은 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수

있다. 경구 투여용의 경우, 본 발명에 따른 CpG ODN은 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 캡슐 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등의 형태로 제형화될 수 있다. 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신)와 활탁제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있다. 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

<50> 또한 비경구 투여용으로는 등장성 수용액 또는 현탁액과 같은 주사용 제형 또는 피부 도포용 제형으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 도포용 제형으로는 본 발명의 약학적 조성물과 약학적으로 허용되는 담체를 배합하여 파우더, 리미멘트(liniment), 젤(gel), 로션(lotion), 크림(cream), 연고제(ointments), 파스타제(pasta), 파프제, 에어로솔제(aerosol), 좌제(suppository) 등의 형태로 제형화할 수 있다. 그 중에서도 연고제가 보다 바람직하다. 상기 담체로는, 각 제형에 따라, 바세린, 유동 파라핀, 겔화 탄화수소 등의 탄화수소류 중

쇄지방산트리글리세라이드, 돈지, 하드 펫트, 카카오지 등의 동식물성 오일 세탄올, 스테아릴알코올, 스테아린산, 팔미틴산이소프로필 등의 고급지방산 알코올 류 지방산 및 이의 에스테르류 폴리에틸렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세롤, 젤라틴, 백당, 당알코올 등의 수용성 기재 글리세린 지방산 에스테르, 스테아린산폴리옥실, 폴리옥시에틸렌경화피마자유 등의 유화제 아크릴산에스테르, 알긴산나트륨 등의 점착제 및 액화석유가스, 이산화탄소 등의 분사제 및 파라옥시벤조산에스테르 류 등의 방부제 등이 사용될 수 있다. 이외에도 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

<51> 본 발명의 CpG ODN의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 CpG ODN를 포함하는 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 전신적으로 투여되는 경우, 본 발명의 약학적 조성물은 약 0.01 μ M 내지 100 mM의 혈중 올리고뉴클레오티드 농도를 수득하기에 충분한 용량으로 일일 투여되는 것

이 바람직하다. 국소적 투여의 경우에는 다른 경로에 의한 투여에 비해 보다 적은 양을 투여할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 CpG ODN의 바람직한 전체 용량은 1일 당 환자 체중 1 kg 당 약 0.01 μ g 내지 100 mg일 수 있다. 그러나, 상기 CpG ODN의 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 CpG ODN의 피부질환의 치료 또는 예방제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

<52> 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다. 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 투여되거나 당업계에 공지된 다른 치료 방법, 예컨대, 화학요법 치료, 방사선 치료, 수술, 타 경구 치료제 및 치료용 연고제[예: 엘리델(Elidel, pimecrolimus)]와 투여될 수 있다. 또한 당분야에 공지된 다른 면역 보조제와 공동 투여될 수 있다. 상기 면역 보조제로는 INF-, IL-12, 시클로스포린(Cyclosporine), FK506(Tacrolimus), TP-5(Thymopoietin pentapeptide, thymopentin) 등을 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 CpG ODN을 함유하는 약학적 조성물은 필요에 따라 테트라사이클린(tetracycline), 옥시테트라사이클린(oxytetracycline), 겐타마이신(gentamicin), 황산 네오마이신(neomycin sulfate), 바시트라신(bacitracin) 및 황산 폴리믹신 B(polymyxin B sulfate), 뮤피로신(mupirocin) 등의 항생제(antibiotics); 디펜히드라민(diphenhydramine), 프로메타딘, 트리페레나민, 페노

티아진, 클로로페니라민, 안타졸린 및 판톨릴 등의 항히스타민제(anti-histamines); 항염제(anti-inflammatory drugs); 항바이러스제(anti-viral drugs) 및 항진균제(anti-fungal agents)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

<53> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<54> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<55> <실시예 1>

<56> 염기 변형에 의한 oligo-4 CpG ODN의 면역반응 조사

<57> 본 발명자들은 이전에 DNase I으로 부분 절단된 대장균의 염색체 DNA 조각 중에서 면역반응을 높은 수준으로 유도하는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 갖는 CpG ODN(이하, 'oligo-4 CpG ODN'이라 함)을 분리하였으며, 상기 oligo-4 CpG ODN이 IL-8 및 IL-12의 프로모터와 NF- κ B를 활성화시키며 혈액성 면역반응을 유도함을 규명하였다(대한민국 특허출원 제2003-13106호). 본 발명자들은 상기 oligo-4 CpG ODN의 염기서열을 변형시켜 다양한 변이체들을 제조하고, 이들의 면역반응을 조사하였다.

<58> <1-1> oligo-4 CpG ODN의 염기 변형

<59> oligo-4 CpG ODN의 염기 변형(base modification)은 다음과 같이 하였다.

oligo-4 CpG ODN(서열번호 2)의 염기서열에 있어서, 5' 말단에서 두 번째 CpG 모티프를 CA 또는 CT 디뉴클레오티드로 치환하였으며, 제조된 ODNs를 'oligo-4-1' 및 'oligo-4-2'이라 각각 명명하였다. 또한, 세 번째 CpG 모티프를 TG 또는 CA 디뉴클레오티드로 치환하였으며, 제조된 ODNs를 'oligo-4-3' 및 'oligo-4-4'라 각각 명명하였다. 또한 oligo-4 CpG ODN의 염기서열에서, 두 번째와 세 번째 CpG 모티프 사이에 있는 4개의 뉴클레오티드(TTGC) 중에서 두 번째 CpG 모티프의 3' 말단 쪽에 있는 디뉴클레오티드(TT)를 AA, CC 및 GG로 이루어진 군에서 선택되는 하나로 치환하였으며, 제조된 ODNs를 'oligo-4-5', 'oligo-4-6' 및 'oligo-4-7'로 각각 명명하였다. 한편, 상기 4개의 뉴클레오티드(TTGC) 중에서 세 번째 CpG 모티프의 5' 말단 쪽에 있는 디뉴클레오티드(GC)를 GA, GT 및 CG로 이루어진 군에서 선택되는 하나로 치환하였으며, 제조된 ODNs를 'oligo-4-8', 'oligo-4-9' 및 'oligo-4-10'으로 각각 명명하였다. 마지막으로, oligo-4 CpG ODN의 염기서열에서, 첫 번째 CpG 모티프의 5' 말단 쪽에 있는 디뉴클레오티드(CT), 첫 번째 CpG 모티프, 첫 번째와 두 번째 CpG 모티프 사이에 있는 디뉴클레오티드(CA), 세 번째 CpG 모티프의 5' 말단 쪽에 있는 디뉴클레오티드(GC) 및 세 번째 CpG 모티프의 3' 말단에 있는 6개의 뉴클레오티드(AACTTC) 중에서 두 번째와 세 번째의 디뉴클레오티드(AC)를 각각 GC, TC, GA, GG 및 TA로 모두 치환하였으며, 제조된 ODN을 'oligo-4-11'이라 명명하였다. 각 ODN의 합성은 (주)제노텍에 의뢰하여 수행하였다. 합성된 모든 ODN은 포스포디에스터 형태의 올리고뉴클레오티드이다. 각 치환 변이체들의 서열정보는 하기 표 1에 나타내었다. 하기 표 1에서 블록은 CpG 모티프를 나타내고, 밑줄은 변이

된 부분을 나타낸다.

<60> [표 1]

<61> oligo-4 CpG ODN의 염기변형

ODNs	염기서열	서열번호
oligo-4	5'-CT CG CAC CG TTGC CG AACTTC-3'	2
oligo-4-1	5'-CT CG CAC <u>ATT</u> GC CG AACTTC-3'	9
oligo-4-2	5'-CT CG CA <u>CTT</u> TG CG AACTTC-3'	10
oligo-4-3	5'-CT CG CAC CG TTGCTGA CG AACTTC-3'	3
oligo-4-4	5'-CT CG CAC CG TTGCCA CG AACTTC-3'	4
oligo-4-5	5'-CT CG CAC CG AA GC CG AACTTC-3'	11
oligo-4-6	5'-CT CG CAC CG <u>CCG</u> C CG AACTTC-3'	12
oligo-4-7	5'-CT CG CAC CG GGG CG AACTTC-3'	13
oligo-4-8	5'-CT CG CAC CG TTGA CG AACTTC-3'	5
oligo-4-9	5'-CT CG CAC CG TTGT CG AACTTC-3'	6
oligo-4-10	5'-CT CG CAC CG TT CGCG AACTTC-3'	7
oligo-4-11	5'-GCT CG A CG TTGG CG ATACTC3'	8

<63> <1-2> oligo-4 CpG ODN의 염기 변형에 따른 면역반응 조사

<64> 상기 실시예 <1-1>에서 제조된 oligo-4 CpG ODN 및 이의 다양한 치환 변이체들이 대식세포의 IL-8 및 IL-12의 프로모터를 활성화시키는지 조사하였다.

<65> a) 마우스 대식세포의 배양

<66> Raw 264.7 세포(ATCC, Manassas, VA)는 10% FBS(Gibco BRL)를 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포 배양은 37℃, 5% CO₂ 배양기(Forma)에서 수행하였다. 세포 배양 중의 생존율과 세포수는 혈구계(hemocytometer)를 이용하여 트립판 블루 익스클루전(trypsin blue exclusion) 방법으로 주기적으로 측정하였다. 모든 실험에서 세포의 생존율은 95% 이상으로 유지시켰다.

<67> b) IL-8/IL-12 프로모터-Luc 리포터 플라스미드의 제작

<68> IL-8 프로모터 영역을 증폭하기 위하여, 인간 게놈 DNA를 주형으로 하고 서열번호 14 및 15의 프라이머 셋트를 이용하여 PCR을 수행하였다. 상기 증폭된 IL-8 프로모터 영역 단편을 *Bgl*II 및 *Hind*III로 절단된 pGL3-Basic 플라스미드 (Promega)에 삽입하였다. 이렇게 하여 IL-8 프로모터-Luc 리포터 플라스미드를 제조하였다(Wu G. D. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:2396-2403, 1997).

<69> 한편, IL-12 프로모터 영역을 증폭하기 위하여, 인간 게놈 DNA를 주형으로 하고 서열번호 16 및 17의 프라이머 셋트를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 IL-12 프로모터 영역 단편을 *Sac* I 및 *Xho* I로 절단된 pGL3-Basic 플라스미드 (Promega)에 삽입하였다. 이렇게 하여 IL-12 프로모터-Luc 리포터 플라스미드를 제조하였다(Wu G. D. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:2396-2403, 1997).

<70> c) 프로모터 활성화 분석: 루시페라제 활성 어세이

<71> Raw 264.7 세포(ATCC, Rockviller, MID)를 5104 cells/well의 농도로 12-웰 플레이트에 분주하였다. 이후, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 상기 b)에서 제조한 IL-8 프로모터-*Luc* 리포터 플라스미드 또는 IL-12 프로모터-*Luc* 리포터 플라스미드와 pRL-null 플라스미드(Promega)로 공동-형질감염(co-transfection)시켰다. 이후, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 표 1에 기재된 CpG ODNs(10 µg/well)를 각 웰에 처리하고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 또는 12시간 동안 배양하였다. 이 때 대조군에는 PBS를 처리하였다. 배양이 완료된 후, 배양액을 제거하였다. 이후, 듀얼-루시페라제 리포터 어세이 시스템(Dual-luciferase reporter assay system, Promega)의 PLB(passive lysis buffer)을 100 µl/well의 농도로 각 웰에 첨가하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 원심분리하고 얻은 상층액(15 µl)을 이용하여 루시페라제 어세이를 수행하였다. 루시페라제 활성은 TD-20/20(Turner designs) 루미노미터(luminometer)를 사용하여 측정하였다. CpG ODN의 처리에 따른 각 프로모터의 활성은 대조군에 대한 상대적인 활성으로 나타내었다. 즉, 대조군의 활성을 '1'로 하여 이에 대한 활성화 배수(fold activation)로 나타내었다.

<72> 그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, IL-8 프로모터 및 IL-12 프로모터 활성화 양상은 매우 유사하게 나타났다. oligo-4 CpG ODN의 염기서열에서 세 번째 CpG 모티프를 변형시킨 경우(oligo-4-3 및 oligo-4-4)와 그의 5' 말단 쪽 염기들을 변

형시킨 경우(oligo-4-8, oligo-4-9 및 oligo-4-10)에는 높은 활성을 나타내었다.

<73>

구체적으로 살펴보면, oligo-4-4, oligo-4-8 및 oligo-4-9 ODNs의 경우에는 oligo-4 CpG ODN 보다 더 높은 활성을 나타내었으며, 그 중에서도 oligo-4-8 ODN이 가장 높은 활성을 나타내었다. 이외에도 oligo-4-3 및 oligo-4-10 ODNs는 oligo-4 CpG ODN에 비해서는 낮았지만, 비교적 높은 활성을 나타내었다. 반면, 두 번째 CpG 모티프의 서열을 변형시킨 경우(oligo-4-1 및 oligo-4-2)와 두 번째 CpG 모티프의 3' 말단 쪽의 디뉴클레오티드의 서열을 변형시킨 경우(oligo-4-5, oligo-4-6 및 oligo-4-7)에는 IL-8 프로모터의 활성이 현저히 감소함을 볼 수 있었다. 또한 oligo-4 CpG ODN의 염기서열에서 두 번째 CpG 모티프와 이의 3' 말단 쪽의 디뉴클레오티드, 그리고 세 번째 CpG 모티프를 제외하고 나머지 다른 염기서열들을 거의 모두 변형시킨 경우(oligo-4-11)에도 높은 활성을 나타내었다. 이로부터 oligo-4 CpG ODN의 염기서열 중에서 두 번째 CpG 모티프와 그의 3' 말단 쪽의 2개의 염기가 IL-8 프로모터 및 IL-12 프로모터의 활성화에 깊이 관여하는 것으로 사료되었다.

<74>

상기 표 1의 CpG ODNs 중에서 치환 변이체의 모체가 되는 oligo-4 CpG ODN 및/또는 상기 oligo-4 CpG ODN의 염기서열에서 가장 많은 변이를 준 oligo-4-11 CpG ODN을 대상으로 이후의 실험을 수행하였다.

<75>

<실시예 2>

<76>

oligo-4 CpG ODN의 골격 변형에 따른 면역반응 조사

<77> <2-1> IL-8 프로모터에 대한 활성화 분석

<78> RAW 264.7 세포에 상기 실시예 <1-2>의 b)에서 제작한 IL-8-*Luc* 프로모터 리포터백터와 pRL-null 플라스미드(Promega)로 공동-형질감염시켰다. 상기 형질감염된 세포에 0형(포스포디에스터 골격) 및 S형(포스포로티오에이트 골격) oligo-4 CpG ODN(0 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 각각 처리하고 8시간 동안 배양하였다. 본 발명에 따른 oligo-4 CpG ODN의 활성을 비교하기 위한 대조군 CpG ODN으로서 0형 1826 ODN(서열번호 18) 및 0형 2006 ODN(서열번호 19)을 사용하였으며, 비(non)-CpG ODN으로서 S형 2041 ODN(서열번호 20)를 사용하였다. 이후, 상기 실시예 <1-2>과 동일한 방법에 따라 수행하여 IL-8 프로모터 활성을 측정하였다.

<79> 그 결과, 도 2에서 보는 바와 같이, CpG ODN의 염기서열에 따라 IL-8 프로모터를 활성화시키는 활성이 다를 수 있었다. 본 발명에 따른 oligo-4 CpG ODN는 골격의 형태에 관계없이(0형 및 S형 모두) 가장 높은 활성을 나타내었다.

<80> <2-2> 사이토카인의 생산 비교 분석

<81> 사람의 말초혈액에서 백혈구 세포를 수집하고, 이를 1.0×10^6 cells/well의 농도로 각 웰에 분주하였다. 이후, 0형 또는 S형 oligo-4 CpG ODN(0 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 각 웰에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 대조군은 상기 실시예 <2-1>와 동일하게 사용하였다. 배양이 완료된 후, 세포 배양액을 분리하였다. 이후, 세포 배양액 내 사이토카인의 수준을 조사하기 위하여, 상용화된 인간 IL-12 p40 시

약(R&D systems, Minneapolis, Minn.) 및 인간 IFN- γ 퀀티킨(Quantikine) M 시약(R&D systems, Minneapolis, Minn.)을 이용하여 샌드위치 ELISA 분석을 각각 수행하였다.

<82> 각 사이토카인(IL-12 p40 및 IFN- γ)에 대한 항체를 카보네이트 버퍼(carbonate buffer, SIGMA, C-3041)에 희석한 후, 이를 96-웰 플레이트(NUNC, 442404)의 표면에 코팅하였다. 3% BSA(SIGMA, A-2154)로 블록킹하였다. 상기 세포 배양액을 적당한 비율로 희석하여 각 웰에 분주하고, 2시간 동안 배양하였다. 바이오틴이 처리된 2차 항체를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, SaV-HRP(Pharmingen, 13047E)와 30분 동안 다시 반응시킨 후, 세척하여 발색시켰다. 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 사이토카인의 수준은 2회 실험에 의한 평균치로 구하였다.

<83> 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이, 본 발명의 oligo-4 CpG ODN는 골격 형태에 관계없이 백혈구 세포에서 IL-12 p40의 생산을 가장 높은 수준으로 증가시켰다. 또한 0형 oligo-4 CpG ODN는 IFN- γ 의 생산도 가장 높은 수준으로 증가시켰으며, S형 oligo-4 CpG ODN 또한 다른 대조군 ODN에 비하여 더 높은 수준으로 백혈구 세포에서 IFN- γ 의 생산을 증가시켰다.

<84> <2-3> 0형 oligo-4 CpG ODN에 의한 염증 관련 사이토카인의 발현 분석

<85> RAW 264.7 세포주에 0형 oligo-4 CpG ODN(10 μ g/ml)을 0.5, 1, 2, 4, 8, 및 12시간 동안 처리하였다. 대조군에는 0형 1826 및 2006 ODN를 동일한 농도로 처리

하였다. 마이크로RNA 분리 키트(MicroRNA Isolation kit, Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. 50U 스트라타스크립트(StrataScript) 역전사효소와 올리고(dT) 프라이머(Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 총 RNA(5 μ g)으로부터 cDNA를 합성하였다. 총 RNA로부터 증폭된 cDNA를 주형으로 하고 하기 표 2에 기재된 각 사이토카인(TNF- α , MIP-2, IL-1, IL-5, IL-10, GM-CSF 및 IL-12)에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 하기 표 2에서 F는 정방향 프라이머를, R은 역방향 프라이머를 나타낸다.

<86> [표 2]

<87> 염증 관련 사이토카인을 증폭하기 위한 프라이머 서열

사이토카인	염기서열(5'→3')	서열번호
TNF- α	F: TCTCATCAGTTCTATGGCCC	21
	R: GGGAGTAGACAAGGTACAAC	22
MIP-2	F: TGGGTGGGATGTAGCTAGTTCC	23
	R: AGTTTGCCTTGACCCTGAAGCC	24
IL-1	F: TTGACGGACCCCCAAAAGATG	25
	R: AGAAGGTGCTCATGTCCTCA	26
IL-6	F: GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	27
	R: TGTACTCCAGGTAGCTATGG	28
IL-10	F: ATGCAGGACTTTAAGGGTTA	29
	R: ATTTCGGAGAGAGGTAGAAACGACCTTT	30
GM-CSF	F: ATGTGGCTGCAGAATTTACTTTTCCT	31
	R: TGGGCTTCCTCATTTTTTGGCCTGGT	32
IL-12	F: CTGGTGCAAAGAAACATGG	33
	R: TGGTTTGATGATGTCCCTGA	34

<89> PCR 증폭은 94℃에서 30초 동안 DNA 변성, 57℃에서 40초 동안 프라이머 어닐링 및 72℃에서 1분 동안 DNA 신장을 한 25 사이클(cycle)로 하여 총 30회 반복 수행하였다. 내부 대조군(internal control)으로서 GAPDH의 발현을 함께 조사하였다.

<90> 그 결과, 도 4에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 0형 oligo-4 CpG ODN의 처리에 의해 TNF- α , MIP-2, IL-1 및 IL-12의 발현이 유도되는 것으로 나타났다. 특히, Th1/Th2 면역반응의 균형에서 Th1 면역반응을 유도하는 대표적인 사이토카인인 IL-12는 본 발명의 oligo-4 CpG ODN에 의해서만 유도되었으며, 이로부터 본 발명의 CpG ODN이 Th1 면역반응을 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다.

<91> 상기 결과들로부터 본 발명의 CpG ODN은 종래 CpG ODNs과는 달리 그 골격 형태에 관계없이 높은 면역활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

<92> <실시예 3>

<93> 아토피 피부염 관련 면역반응을 조사하기 위한 시험관 내 분석

<94> <3-1> 수지상 세포의 활성화 분석

<95> 아토피 피부염 모델 동물로부터 분리된 수지상 세포가 본 발명의 CpG ODN에 의해 활성화되는지 조사하였다.

<96> a) 수지상 세포의 분리 및 CpG ODN 처리

<97> 아토피 피부염 모델 동물인 NC/Nga 마우스(SLC, Hamatsu, Japan)의 대퇴부의 골수로부터 전구 세포를 분리하였다. 분리된 전구 세포에 RBC 용해 용액(150 mM NH_4Cl , 10 mM potassium carbonate, 0.1 mM EDTA pH 7.4)을 첨가하여 5분간 상온에서 반응시켰다. 이후, 원심분리로 세포를 회수하고, 무혈청 RPMI 배지로 3회 세척하였다. 세포를 트립판 블루(trypan blue)로 염색하고 혈구계산법(hemocytometer)으로 세포수를 측정하였다. 상기 세포를 6-웰 플레이트(Nunc)에 2×10^6 cells/well의 농도로 분주하였다. 골수의 전구 세포를 수지상 세포로 분화시키기 위하여 IL-4와 GM-CSF(biosource)를 각각 10 ng/ml의 농도로 첨가한 10% FBS 함유 RPMI 배지를 각 웰에 가하였다(Ghosh, M., *J Immunol.* 170: 5625-5629, 2003). 세포를 37°C에서 5% CO_2 를 함유한 배양기에서 배양하였다. 세포는 2일마다 배지를 교체하면서 6일간 배양하였다. 이후, 본 발명에 따른 0형 CpG ODN를 농도별로(4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리하였다. 이 때 본 발명의 CpG ODN으로는 0형의 oligo-4 CpG ODN(서열번호 2) 및 이의 염기서열에서 가장 많은 변이를 준 0형의 oligo-4-11 ODN(서열번호 8)를 사용하였다. 음성 대조군에는 아무것도 처리하지 않았으며, 양성 대조군에는 LPS(100 ng/ml)을 처리하였다.

<98> b) FACS 분석

<99> 상기 a)에서 본 발명의 CpG ODNs(0형 골격) 또는 LPS를 처리한 수지상 세포를 세포 배양액으로부터 회수하고 세척하였다. 이후, 세포 현탁액에 수지상 세포

의 표면 분자인 MHC class II, CD80 및 CD86에 대한 각 항체(Pharminen)를 넣고 30분간 4℃에서 반응시켰다. 원심분리하여 상층액을 제거하고, PBS로 1회 세척하였다. MHC class II, CD80 및 CD86에 대한 2차 항체[anti-hamster IgG2(CD80에 대한 2차 항체, BD pharminen), anti-rat IgG2a (CD86, MHC class II에 대한 2차 항체, BD pharminen)]를 넣고 다시 30분간 4℃에서 반응시켰다. 세포를 원심분리하여 세척하였다. 이후, 세포를 PI 염색법으로 염색하여 표면 분자들의 활성화 정도를 FACS 분석으로 조사하였다.

<100>

그 결과, 도 5에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 0형 CpG ODNs(oligo-4 및 oligo-4-11) 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 경우, 수지상 세포의 표면 분자인 MHC class II, CD80 및 CD86의 발현이 대조군에 비해 증가됨을 볼 수 있었다. 이로부터 본 발명에 따른 0형 CpG ODNs가 수지상 세포의 표면 분자를 활성화시킴을 확인할 수 있었다. 또한 본 발명의 CpG ODNs를 4 및 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 경우 CD80 및 CD86의 발현이 농도 의존적으로 증가됨을 확인할 수 있었다(도 6 참조). 상기 결과들로부터 본 발명의 CpG ODN이 체내 면역력을 활성화시킬 수 있는 수지상 세포를 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

<101>

<3-2> 수지상 세포에서의 사이토카인 발현 분석

<102>

본 발명에 따른 0형 CpG ODN을 처리한 수지상 세포에서의 IL-12의 발현량을 조사하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

<103>

먼저, 상기 실시예 <3-1>에서 아토피 피부염 모델 동물인 NC/Nga 마우스로부터

터 분리된 수지상 세포에 0형 oligo-4 CpG ODN을 시간별(0, 0.5, 1, 2, 4 및 8 시간)로 처리하였다. 대조군에는 0형 1826 CpG ODN과 2041 비-CpG ODN을 각각 처리하였다. 상기 1826 CpG ODN은 S형으로 골격을 변형시킨 경우 IL-12의 발현을 높은 수준으로 유도하는 것으로 알려진 것이다(Lee, KW. *et al.*, *Mol. Immunol.* 41:955-964, 2004). 이후, TRIzol(Invitrogen)을 이용하여 수지상 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 총 RNA(5 μ g)에 M-MLV 역전사 효소(invitrogen)를 처리하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 70°C에서 5분간 비활성화시켜 cDNA를 제조하였다. 이렇게 제조한 cDNA를 주형으로 하고 IL-12에 특이적인 프라이머 셋트(서열번호 33 및 34)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 증폭은 95°C에서 30초 동안 DNA 변성 57°C에서 40초 동안 프라이머 어닐링 및 72°C에서 1분 동안 연장을 한 사이클로 하여 총 25회 반복 수행하였다. PCR 반응이 완료된 후, 1% 아가로스 겔에서 증폭된 PCR 산물을 확인하였다. 그 결과, 도 7에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 0형 CpG ODN에 의해서만 IL-12의 발현이 유도됨을 확인할 수 있었다. 한편, S형의 1826 CpG ODN이 IL-12의 발현을 높은 수준으로 유도한다고 보고된 것과는 달리(Lee, KW. *et al.*, *Mol. Immunol.* 41:955-964, 2004), 0형의 1826 CpG ODN에 의해서는 IL-12의 발현이 유도되지 않았다.

<104> <3-3> 면역 세포의 증식 유도 활성 분석

<105> a) T 림프구(T lymphocyte)의 증식 유도

<106> 본 발명의 CpG ODN이 T 림프구의 증식을 유도하는지 알아보기 위하여 다음의

실험을 수행하였다.

<107>

아토피 피부염 모델 동물인 NC/Nga 마우스(SLC, Hamamatsu, Japan)의 대퇴부의 골수로부터 수지상 세포를 분리하여 6일간 배양하였다. 이후, 상기 수지상 세포에 0형 oligo-4 및 oligo-4-11 CpG ODNs를 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 48시간동안 처리하였다. 대조군에는 CpG ODN을 처리하지 않았다. 48시간 이후, 20 Gray로 γ -조사(irradiation)한 후 세포를 둥근 바닥(round-bottom) 96-웰 플레이트에 1.0104~1.0105 cells/well의 농도로 첨가하였다. 이후, 자극제(stimulator)인 수지상 세포와 리스폰더(responder) T 림프구의 비율이 1:0 또는 1:10이 되도록 하여 리스폰더 T 림프구(NC/Nga 마우스의 비장에서 분리함)를 1.0×10^5 cells/well의 농도로 각 웰에 첨가하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 반응시켰다. 각 웰에 [³H]티미딘(1Ci; Amersham)을 첨가하여 16시간 동안 반응시켰다. 세포 채취(harvest) 기계를 이용하여 각 웰의 세포를 여과 종이에 모아서 상온에서 건조시켰다. 이후, 수용성 섬광 계수기(aqueous scintillation counter, Amersham)를 바이얼(bial)에 2 ml씩 분주한 후, 여기에 각각의 여과종이를 넣고 녹였다. β -계수기를 이용하여 cpm(counter per minute) 값을 측정하였다. 측정 횟수는 3번 반복을 기본으로 하였다.

<108>

그 결과, 도 8에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 0형 CpG ODNs이 T 림프구의 증식을 유도함을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 CpG ODNs(oligo-4 및 oligo-4-11)를 아토피 피부염 환자에 투여하는 경우, T 림프구를 증식시켜 면역력

을 증진 시킬 수 있음을 나타낸다.

<109> b) 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood monocyte cells, PBMCs)의 증식

유도

<110> 아토피 피부염 환자에서 채취한 말초혈액으로 AMLR(autologous mixed lymphocyte reaction) 수행시 반응이 감소되어 있음이 보고되었다(Leung DYM, . *J. Clin. Invest.*, 72:1482-1486, 1983). 따라서 본 발명자들은 아토피 피부염 환자로부터 분리된 PBMC의 증식이 본 발명의 CpG ODN에 의해 증가되는지 조사하였다.

<111> 아토피 피부염 환자의 혈액으로부터 Histopaque-1077(Sigma, Poole, UK)를 이용하여 PBMCs를 분리하였다. 분리한 PBMCs의 세포를 96 well 둥근-바닥 플레이트에 3105 cells/well의 농도로 첨가하였다. 각 웰에 본 발명의 0형 CpG ODNs(oligo-4 및 oligo-4-11)를 첨가하고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 반응시켰다. 이후, 각 웰에 [³H]티미딘(1Ci; Amersham)을 첨가하여 16시간 동안 반응시켰다. 세포 채취(harvest) 기계를 이용하여 각 웰의 세포를 여과 종이에 모아서 상온에서 건조시켰다. 이후, 수용성 섬광 계수기(aqueous scintillation counter, Amersham)를 바이얼(bial)에 2 ml씩 분주한 후, 여기에 각각의 여과종이를 넣고 녹였다. β-계수기를 이용하여 cpm(counter per minute) 값을 측정하였다.

<112> 그 결과, 도 9에서 보는 바와 같이, PBMC의 증식이 본 발명에 따른 CpG ODNs에 의하여 매우 높은 수준으로 증가함을 확인할 수 있었다.

<113> <실시예 4>

<114> 본 발명의 CpG ODN의 피부 투과 분석

<115> <4-1> 본 발명의 CpG ODN을 함유하는 연고제의 제조

<116> 본 발명에 따른 0형 oligo-4 CpG ODN을 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 FITC(fluorescein isothiocyanate)로 표지하였다. 이후, FITC로 표지된 0형 oligo-4 CpG ODN 10 mg을 페트로라툼(petrolatum, 삼아제약, 대한민국) 5 g과 혼합하여 연고제로 제조하였다.

<117> <4-2> 피부 투과 분석

<118> 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga 마우스(SLC, Hamatsu, Japan) 등의 털을 제거하였다. 이후, 상기 실시예 <6-1>에서 제조된 0.5 mg의 CpG-ODN을 포함한 연고제를 마우스의 등에 도포하였다. 연고제를 도포한 후 1일째 및 5일째에 1.5×1.5 cm² 면적의 피부를 적출하여 액체 질소로 냉동시켰다. 이후, 티슈-텍 OCT 화합물(Tissue-Tek OCT compound, Sakura Finetek USA, INC.)로 삽입하고, 크라이어스탯(cryostat)를 이용하여 5 μ m의 두께로 잘랐다. 절단된 조직을 형광 현미경으로 관찰하였다.

<119> 그 결과, 도 10의 A에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 0형 CpG ODN가 마우스의 피부 안으로 침투되어 5일까지도 남아있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 도포한 지 24시간 후에 본 발명의 CpG ODN이 림프절에 침투한 것을 확인할 수 있었

다(도 10의 B 참조).

<120> <실시예 5>

<121> 아토피 피부염 치료 효과를 조사하기 위한 생체 내 분석

<122> <5-1> 본 발명의 CpG ODN-함유 연고제의 도포

<123> NC/Nga 마우스 6 마리를 2개의 군으로 분류하였다: CpG ODN 처리군 및 무처리군. 처리군의 마우스에는 상기 실시예 <4-1>에서 제조한 0형 oligo-4 CpG ODN을 함유하는 연고제(0.2 mg CpG-ODN/ 마우스1 마리)를 마우스의 등에 있는 아토피 피부염 병변 부위에 연고제를 도포하였다. 무처리군의 마우스에는 본 발명의 CpG ODN이 첨가되지 않은 페트로라툼을 동일한 조건으로 도포하였다.

<124> <5-2> 병변의 관찰

<125> 본 발명의 CpG ODN 함유 연고제를 도포한 후 5일째 및 7일째에 아토피 피부염의 병변 부위를 육안으로 관찰하였다. 그 결과, 도 11의 A에서 보는 바와 같이, 무처리군의 마우스와 비교할 때에 본 발명의 0형 CpG ODN을 도포한 마우스의 등에서 피부 병변의 소실이 관찰되었다. 또한, 마우스의 등 피부를 적출하여 H&E 염색법에 의해 아토피 피부염의 치료 효과를 조사하였다. 그 결과, 도 11의 B에서 보는 바와 같이, 본 발명의 0형 CpG ODN을 도포한 마우스의 병변에서는 과각화증(hyperkeratosis)과 극세포증(acanthosis)이 현저히 감소하고, 진피 내 림프구의 침윤도 감소하여 아토피 피부염이 성공적으로 치료됨을 확인하였다(× 200배 관

찰).

<126> <5-3> 조직학적 분석

<127> a) 사이토카인의 발현 분석

<128> 본 발명의 0형 CpG ODN를 함유하는 연고제를 도포한 지 5일째 1.51.5 cm² 면적의 피부를 적출하였다. 이후, 4% 포르말린 용액에서 하루 이상 고정시켰다. 고정된 피부 조직에 파라핀을 처리하여 5 μ m의 두께로 잘라내었다. 파라핀을 제거한 후, LSAB+ kit (DAKO, Denmark)의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 3% H₂O₂를 10분간 처리하였다. 이후, 0.1% BSA를 함유하는 TBS(Tris-buffered saline, pH7.4)으로 희석한 10% 정상 염소 혈청을 첨가하고, 1시간 동안 상온에서 블록킹하였다. PBS(pH 7.4)로 세척한 후, 1차 항체-goat anti-mouse IL-10, goat anti-mouse IL-4(Santa Cruz, USA), rat anti-mouse IFN- γ (Pierce, USA)-를 처리하고 4℃에서 12시간 이상 반응시켰다. 이후, 바이오틴으로 표지된 2차 항체를 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 그리고 나서, 퍼옥시다제(peroxidase)로 표지된 스트렙타비딘(streptavidin)을 첨가하여 상온에서 약 30분 동안 반응시켰다. DAB Substrate chromogen system(DAKO, Denmark)을 이용하여 염색한 후 현미경을 통해 관찰하였다(\times 200배 관찰).

<129> 그 결과, 도 12에서 보는 바와 같이, 본 발명의 0형 CpG ODN을 도포한 지 5일 되는 마우스의 표피에서는 IL-4 및 IL-10의 발현이 감소된 반면, IFN- γ 의 발현

은 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 0형 CpG ODN이 아토피 피부염에서 특이적으로 높은 Th2 표현형 T 림프구에 의해 매개되는 사이토카인인 IL-4 및 IL-10의 생성을 낮추는 반면, Th1 표현형 T 림프구에 의해 매개되는 사이토카인인 IFN- γ 의 생성을 증가시킴으로써 아토피 피부염의 증상을 호전시키고 치료함을 나타내는 것이다.

<130> b) 조직내 CD4+ 및 CD8+ 림프구의 염색

<131> 본 발명의 0형 CpG ODN를 함유하는 연고제를 도포한 지 5일째 1.5×1.5 cm² 면적의 피부를 적출하였다. 적출된 피부 조직을 액체 질소로 냉동시켰다. 이후, 티슈-텍 OCT 화합물(Tissue-Tek OCT compound, Sakura Finetek USA, INC.)로 삽입하고, 크라이어스탯(cryostat)을 이용하여 5 μ m의 두께로 잘랐다. 절단된 조직에 1차 항체-rat anti-mouse CD4 mAb (BD phamingen, USA) 또는 rat anti-CD8 mAb (Serotec, UK)-를 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 이후, 바이오틴으로 표지된 2차 항체를 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 그리고 나서, 퍼옥시다제(peroxidase)로 표지된 스트렙타비딘(streptavidin)을 첨가하여 상온에서 약 30분 동안 반응시켰다. DAB Substrate chromogen system(DAKO, Denmark)을 이용하여 염색한 후 현미경을 통해 관찰하였다. 사진은 모두 $\times 200$ 배로 찍었다.

<132> 그 결과, 도 13에서 보는 바와 같이, 본 발명의 0형 CpG ODN을 도포한 마우스의 피부에서 CD4+ 및 CD8+ 림프구 세포가 감소했음을 확인할 수 있었다. 아토피 피부염의 병변에서 CD4+ 및 CD8+ 림프구 세포가 감소하는 것은 아토피 피부염의 치

료에 매우 효과적인 현상이다(Christian V., *et al.* *J Clin Invest.* 104:1097-1105, 1999).

<133>

<5-4> 혈청 내 IgE 수준 분석

<134>

각 군의 마우스를 에테르로 마취한 후, 즉시 대정맥으로부터 혈액을 채취하여 헤파린이 처리된 튜브에 넣었다. 이후, 1000 g에서 10분간 원심 분리하여 혈장을 수득하고, 사용하기 전까지 -20℃ 에서 보관하였다. 총 IgE 수준은 마우스 IgE BD OptEIA Kit(BD pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. 실험 방법은 BD OptEIA Kit의 매뉴얼 과정에 따라 실시하였다. 먼저, 96웰 플레이트의 각 웰에 IgE 캡처 항체(capture Ab)를 100 μ l씩 첨가하고, 4℃에서 12시간 이상 반응시켰다. 웰 안의 용액을 제거하고, 세척 버퍼(PBS, 0.05% Tween-20)로 3회 세척하였다. 이후, 블로킹 버퍼(PBS, 10% FBS) 200 μ l를 각 웰에 넣고 상온에서 1시간 반응시켰다. 블로킹 버퍼를 제거하고 상기 세척 버퍼로 3회 세척하였다. 각 마우스로부터 얻은 혈장 샘플을 각각 100 μ l씩 각 웰에 첨가하고, 상온에서 2시간 반응시켰다. 이후, 웰 안의 용액을 제거하고 상기 세척 버퍼로 5회 세척하였다. 아비딘-HRP(avidin-horseradish peroxidase)가 결합되고 바이오틴으로 표지된 마우스 IgE 항체(BD pharmlngen, USA) 100 μ l를 각 웰에 첨가하고 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 7회 세척하였다. TMB 기질 용액 (BD pharmlngen, USA) 100 μ l를 각 웰에 첨가하고, 상온의 어두운 곳에서 30분간 반응시켰다. 정지 용액 1M phosphoric acid(BD pharmlngen, USA) 50 μ l을 각 웰에 첨가하였다. 정지

용액을 첨가한 후 30분 내에 ELISA 리더로 파장 450 nm에서 상기 용액의 흡광도를 측정하였다.

<135> 그 결과, 도 14에서 보는 바와 같이, 본 발명의 0형 CpG ODN를 함유하는 연고제를 도포한 마우스에서는 혈청 내 IgE 수준이 현저히 감소하였다.

<136> 상기 결과들로부터 본 발명의 0형 CpG ODN이 Th2-림프구에 의해 매개되는 사이토카인의 발현을 감소시키는 반면, Th1-림프구에 의해 매개되는 사이토카인의 발현은 증가시켜 혈청 내 IgE 수준을 감소시킴을 통해 아토피 피부염의 치료에 매우 우수한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

<137> <적용예 1>

<138> 바이러스성 피부질환

<139> 바이러스성 피부질환은 면역상태가 저하된 사람 또는 만성질환자에서 잘 발생한다. 이들에서는 타입 1 T세포 면역 반응(type 1 T cell responses)이 저하된 반면, 타입 2 T세포 면역 반응은 증가되어 있다(Hengge U.R., *et al.*, *Br J Dermatol.*, 149:15-19, 2003; Katakura T., *et al.*, *Clinical Immunol.* 105: 363-370, 2002). 이들 바이러스성 질환에는 전염성 연속증, 사마귀, 헤르페스 바이러스 감염 등이 있으며, IL-12를 직접 주입하거나, IL-12를 증진시키는 치료를 함으로써 이들 이들 감염 질환의 성공적인 치료를 할 수 있다(Arany I., *et al.*, *Antiviral Res.*, 43: 55-63, 1999 Matsuo, R., *et al.*, 59:623-630, 1996;

Katakura, T., *et al.*, *Clin. Immunol.*, 105:363-370, 2002). 따라서 본 발명의 CpG-ODN의 IL-12 증진 효과는 바이러스성 피부 질환의 치료에 대단히 효과적이다.

<140> <적용예 2>

<141> 피부암

<142> 피부암 발생은 면역억제 또는 저하된 사람에게서 잘 발생하며 이들에서 특히 세포성 매개 면역에 관여하는 Th1 면역 반응이 떨어져 있고, Th2 면역 반응이 증대한 것으로 보고되어 있다(Rook AH., *et al.*, *Ann N Y Acad Sci.*, 795: 310-318, 1996). IL-12는 전염성 감염과 종양에 대한 면역 반응을 유발하여 이들 질환을 치료할 수 있는 사이토카인으로 알려져 있으며 이의 효과는 생체내 IFN- γ 를 생성함으로써 나타나는 것으로 알려져 있다(Trinchieri G., *et al.*, *Annu Rev Immunol.* 13: 251-276, 1995). IL-12가 피부암 치료에 이용될 수 있다는 보고와 함께 CpG-ODN이 마우스에서 악성 흑색종 치료에 효과적이라는 보고가 있다(Gollob JA., *et al.*, *J Clin Oncology.*, 21: 2564-2573, 2003; Krepler C., *et al.*, *J invest Dermatol.*, 122: 387-391, 2004). 따라서 본 발명의 CpG-ODN에 의한 IL-12의 증진 효과는 피부암의 치료에 대단히 효과적일 것이다.

<143> <적용예 3>

<144> 아토피 피부염 및 알레르기 피부질환

<145> 아토피 피부염의 병인기전은 아직까지 확실치 않으나 IL-4와 IL-5를 포함한

Th2 사이토카인을 생산하는 알레겐 특이적 T 세포에 의해 질환이 유발된다고 생각되고 있으며, 아토피 피부염 환자의 병변에서 이들 세포의 침윤이 증명되었다 (Neumann C., *et al.*, *J Mol Med.*, 74: 401-406, 1996). 아토피 피부염 환자로부터 단핵구 또는 단핵구로부터 유래된 수지상 세포를 LPS(lipopolysaccharide)로 자극시 정상인에 비해 IL-12 p40의 생산이 현저히 감소한다고 보고된 바 있다(Aiba S., *et al.*, *Exp Dermatol.*, 12: 86-95, 2003). 이와 함께 영아의 제대혈로부터 IL-12를 생산하는 단핵구의 수가 감소된 것이 IgE 생산의 증가와 관련이 있으며 이들에서 아토피 피부염 발생 가능성이 높은 것으로 보고되었다(Nilsson C., *et al.*, *Clin Exp Allergy.*, 34: 373-380, 2004). Th1/Th2 면역 반응을 결정하는 중요한 인자 중의 하나가 IL-12라는 것을 감안할 때 본 발명의 CpG-ODN이 수지상 세포에서 IL-12 생산을 증가시키는 것은 아토피 피부염 및 알레르기 피부질환에서 충분한 치료 효과를 갖는다는 것을 제시해 준다.

【발명의 효과】

<146>

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 CpG ODNs은 그 골격의 형태에 관계없이 피부질환의 치료 또는 예방에 효과적인 면역 반응을 유도한다. 따라서 본 발명에 따른 CpG ODNs, 특히 0형의 CpG ODNs은 피부질환의 치료 또는 예방제로서 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기의 일반식으로 표시되고 적어도 2개 이상의 비메틸화된 CpG 모티프를 가지는 염기서열로 이루어진 분리된 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 (oligodeoxynucleotide)를 유효성분으로 함유하는 피부질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물:

[일반식]: SYSSACGTTSNYRAWMYTC(서열번호 1)

여기에서, S는 G 또는 C이고 Y는 C 또는 T이고 N은 A, G, T 및 C로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나이고 R은 G 또는 A이고 W는 A 또는 T이고 및 M은 A 또는 C이다.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 일반식에서 'YS' 또는 'YR' 디뉴클레오티드 (dinucleotide)가 'CG'인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드는 서열번호 2 내지 서열번호 8로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드는 서열번호 2 또는 서열번호 8의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

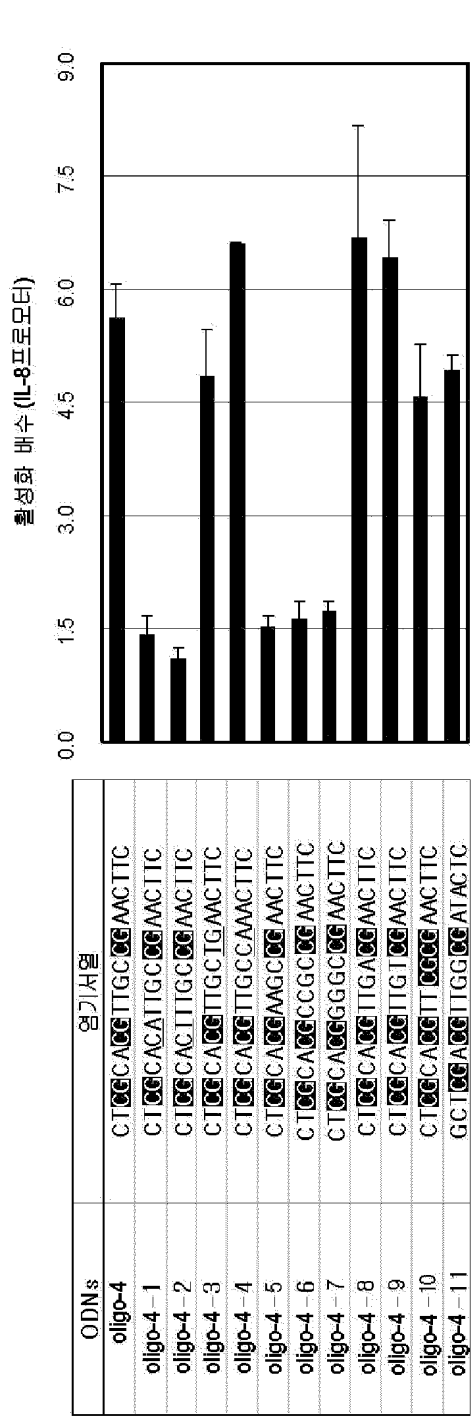
【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드는 포스포디에스터(phosphodiester) 또는 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 골격으로 변형된 것임을 특징으로 하는 조성물.

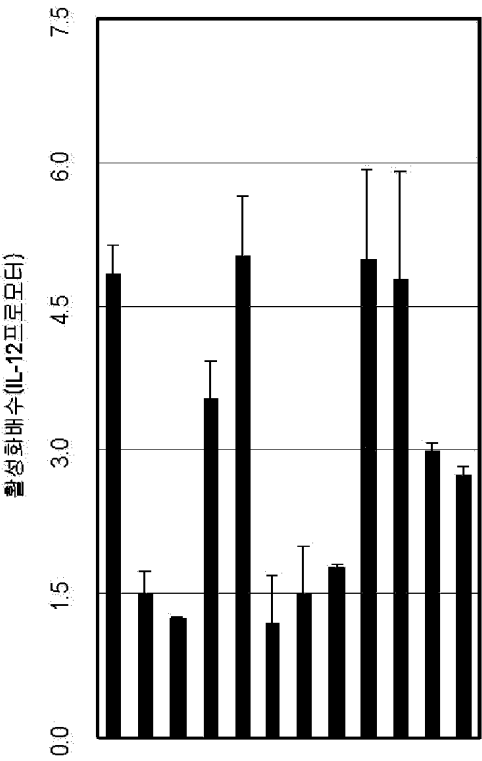
【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 피부질환은 아토피 피부염, 알레르기 피부질환, 바이러스성 피부질환 및 피부암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

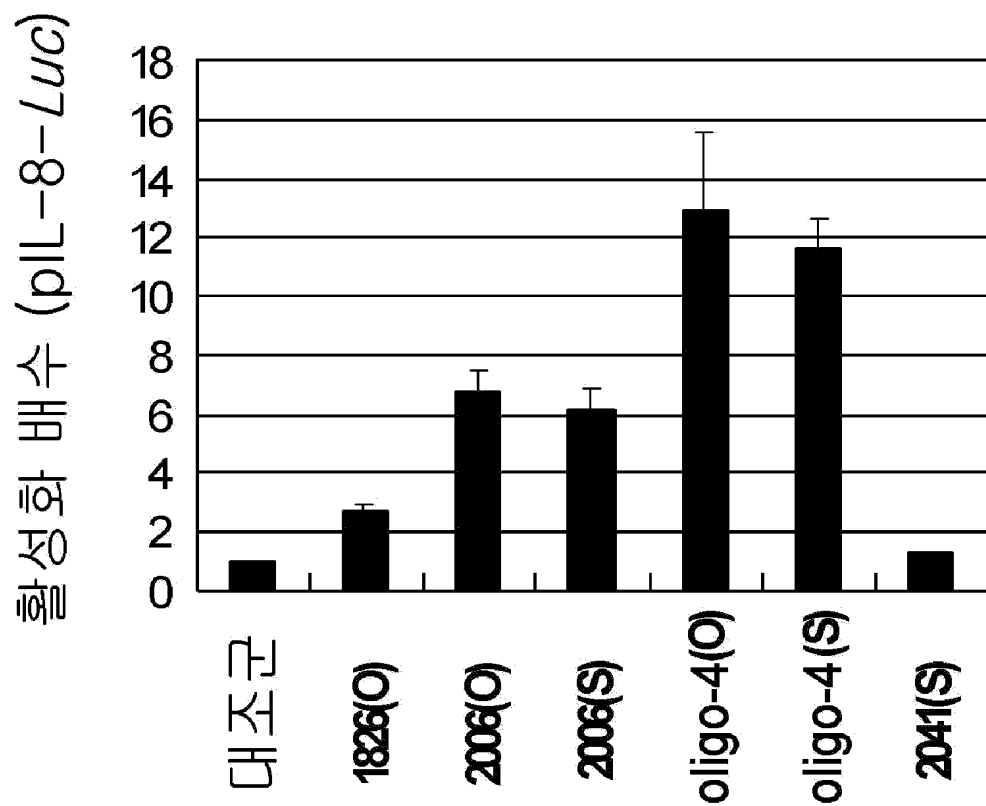
【표 1】



【도면】

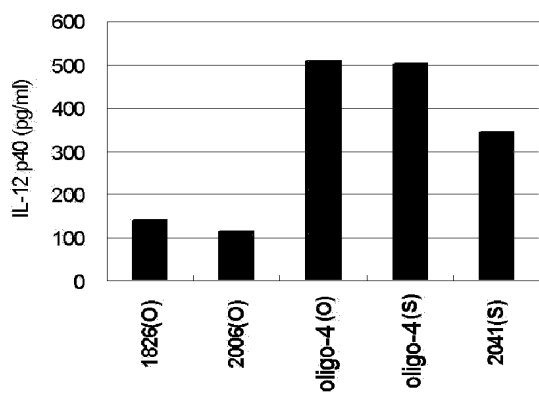


【도 2】

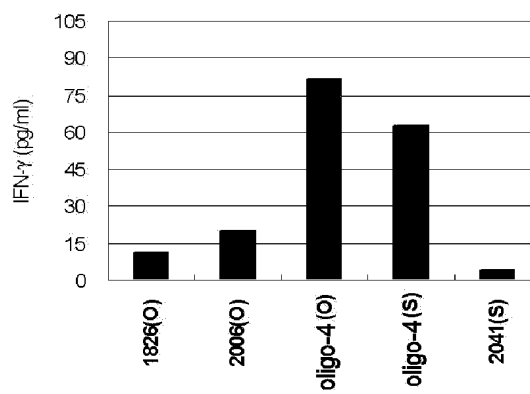


【도 3】

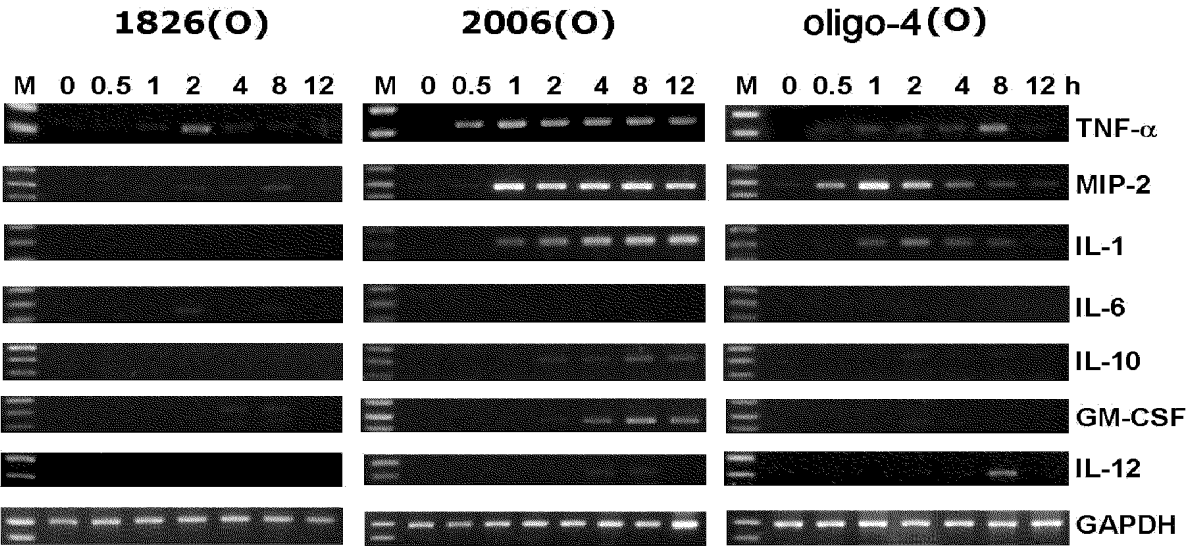
A. IL-12 p40



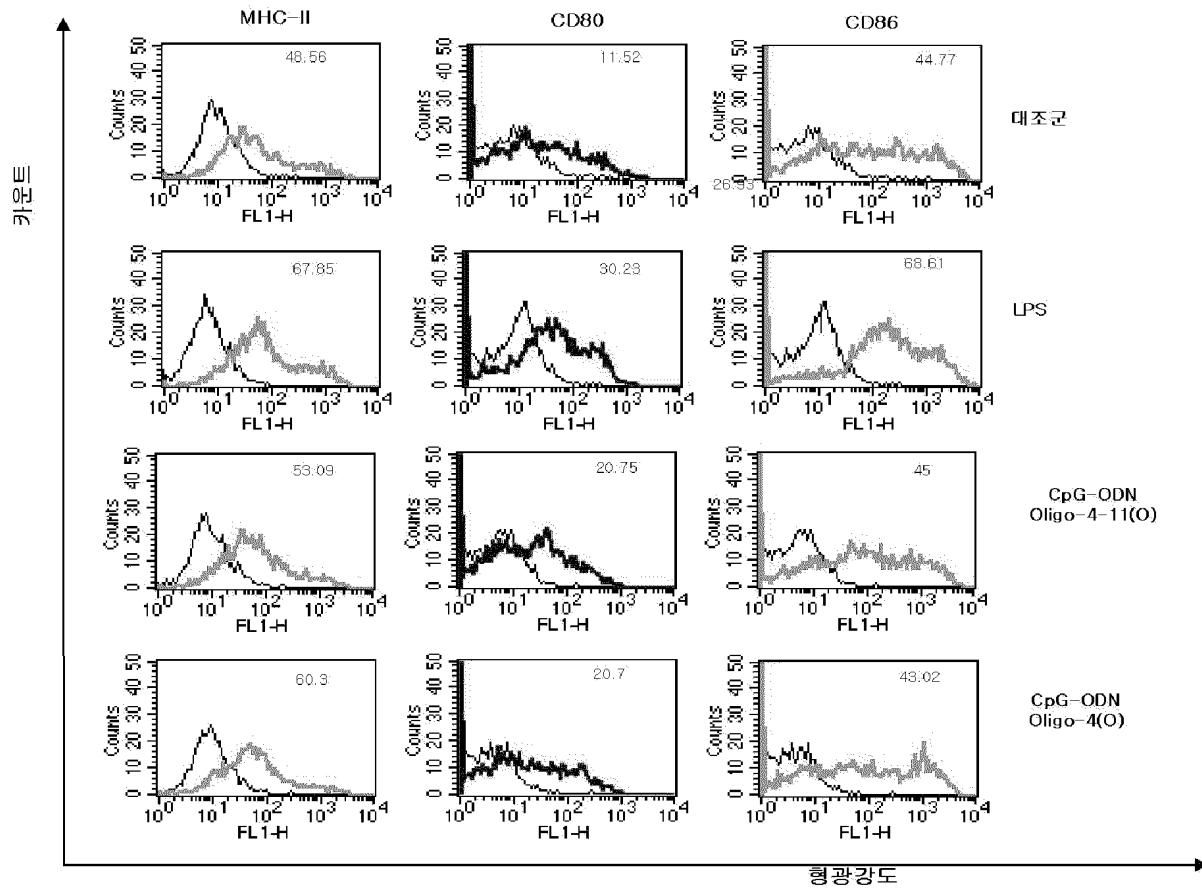
B. IFN- γ



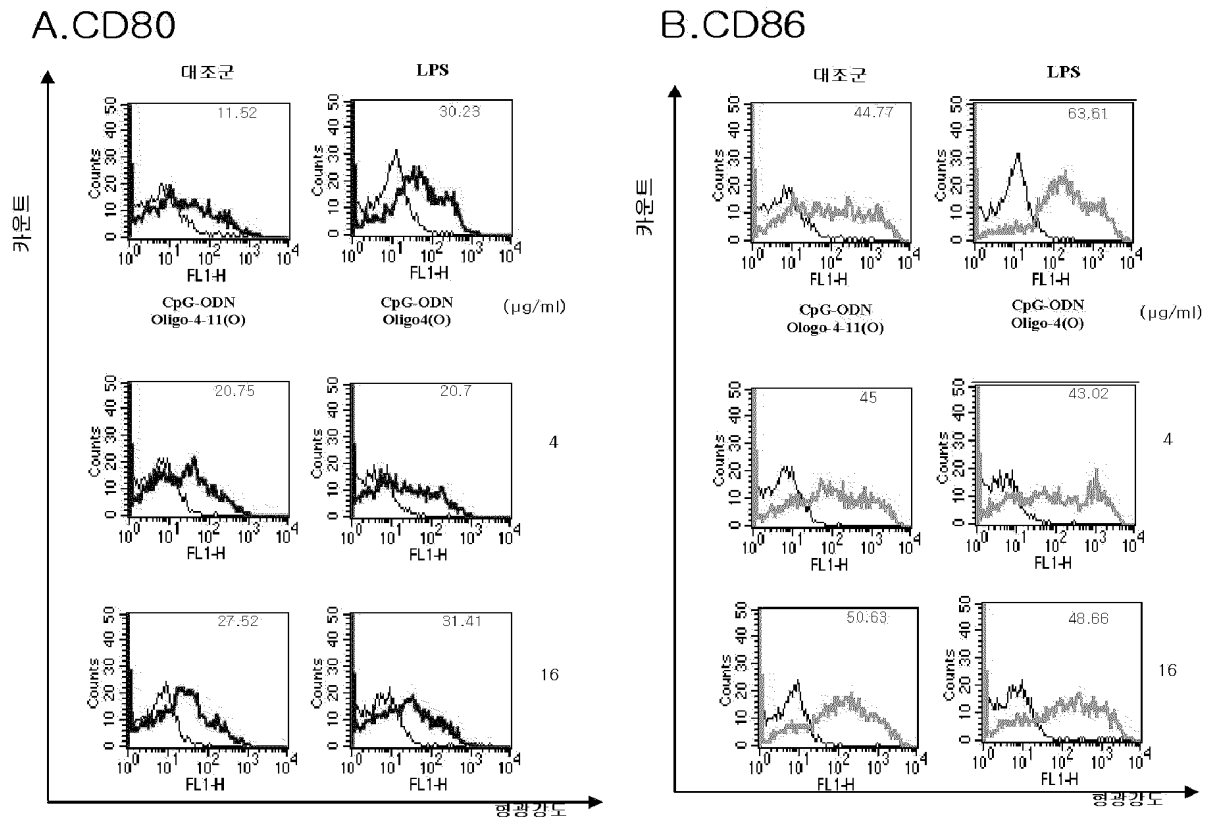
【도 4】



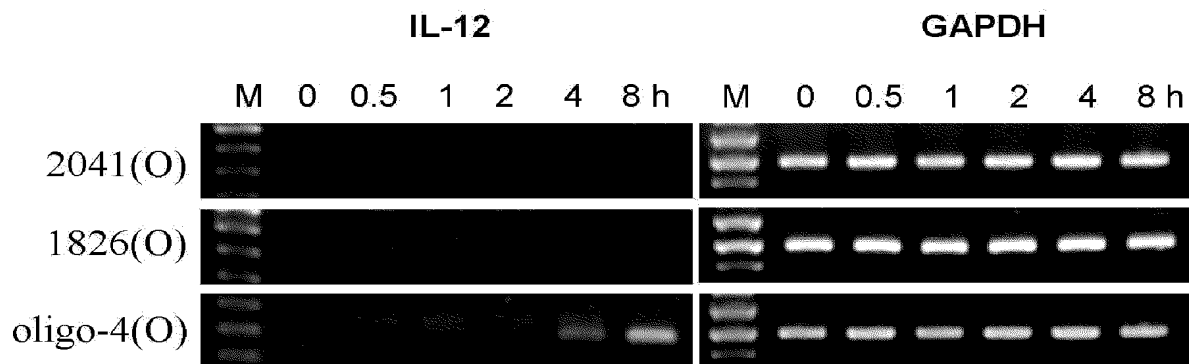
【도 5】



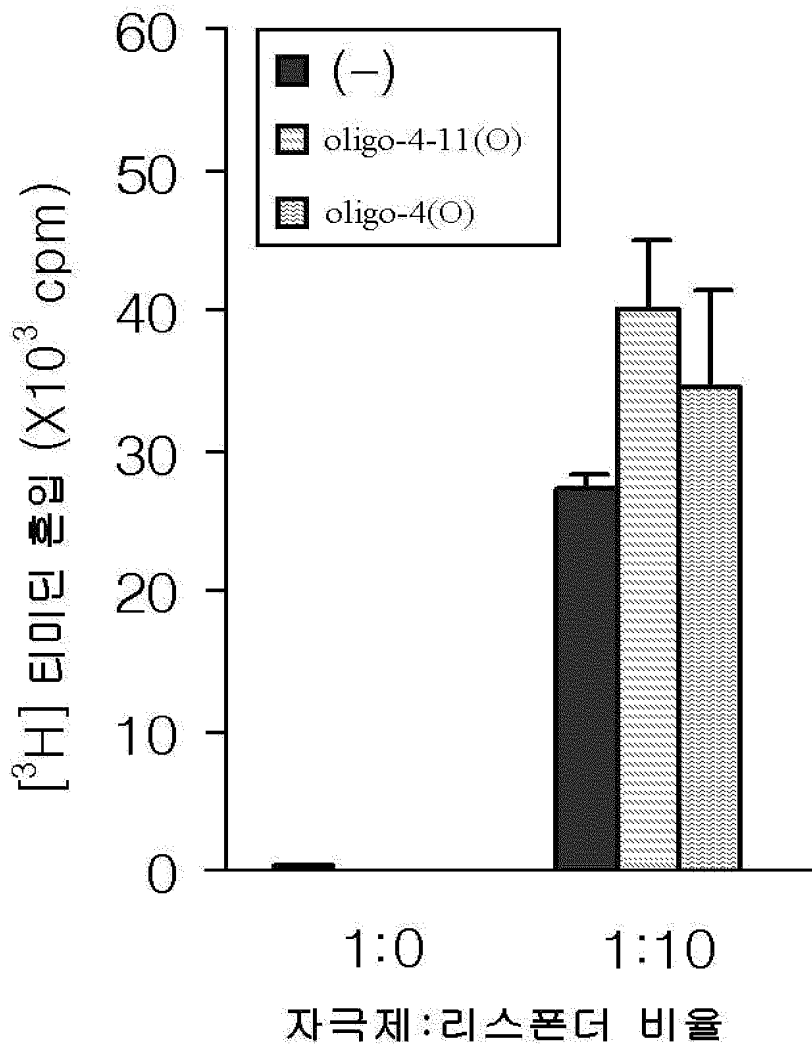
【도 6】



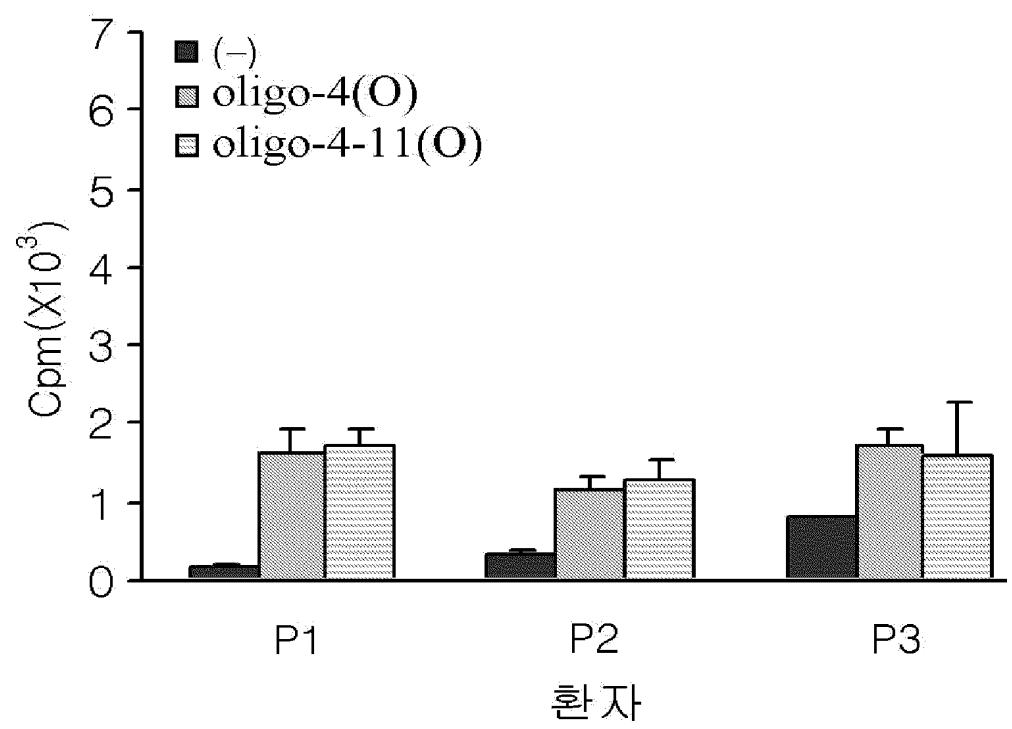
【도 7】



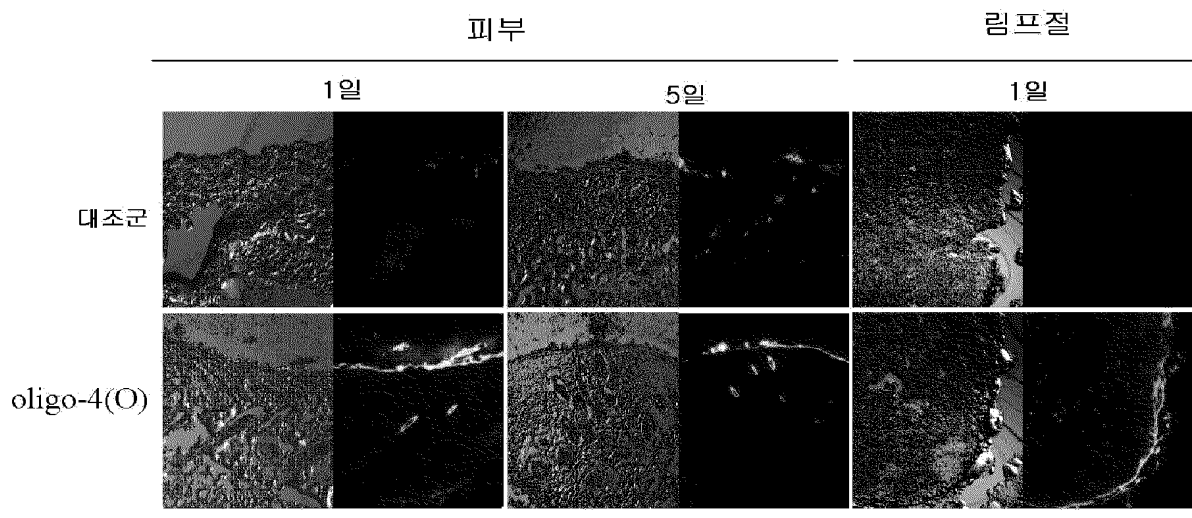
【도 8】



【도 9】

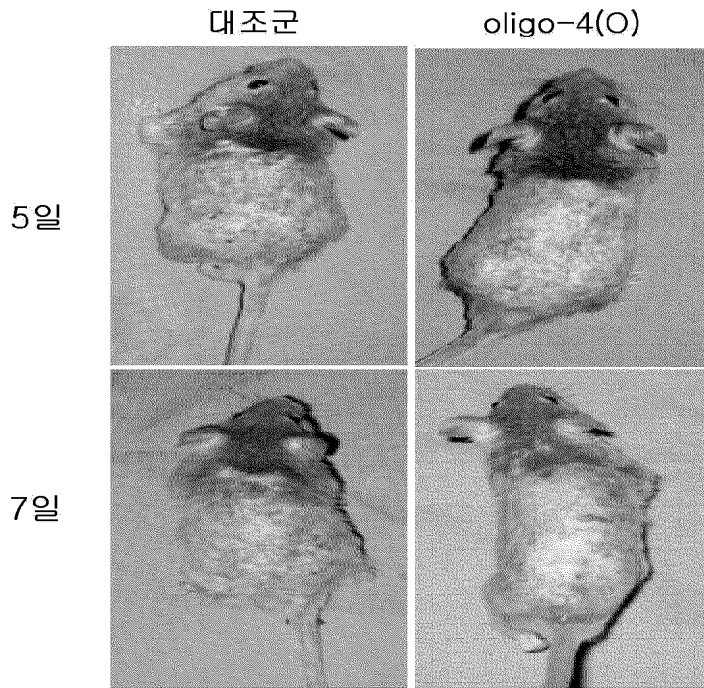


【도 10】

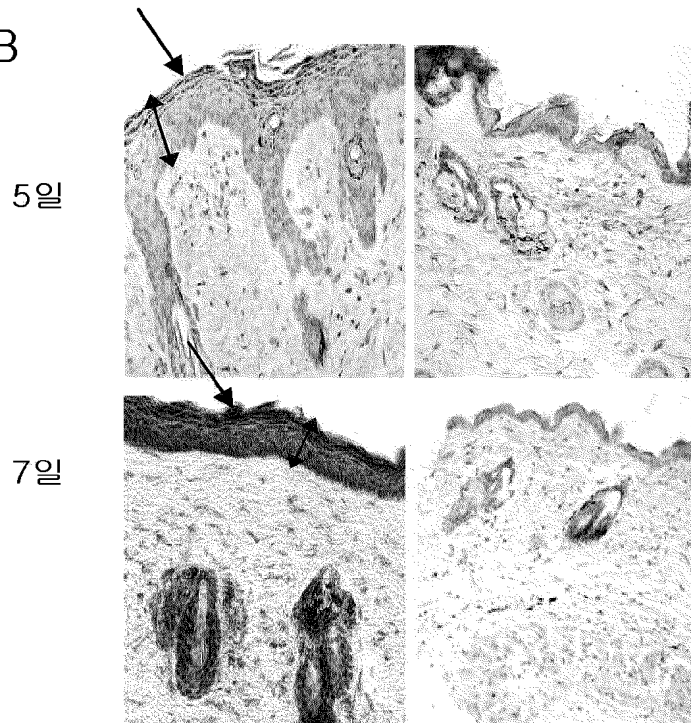


【도 11】

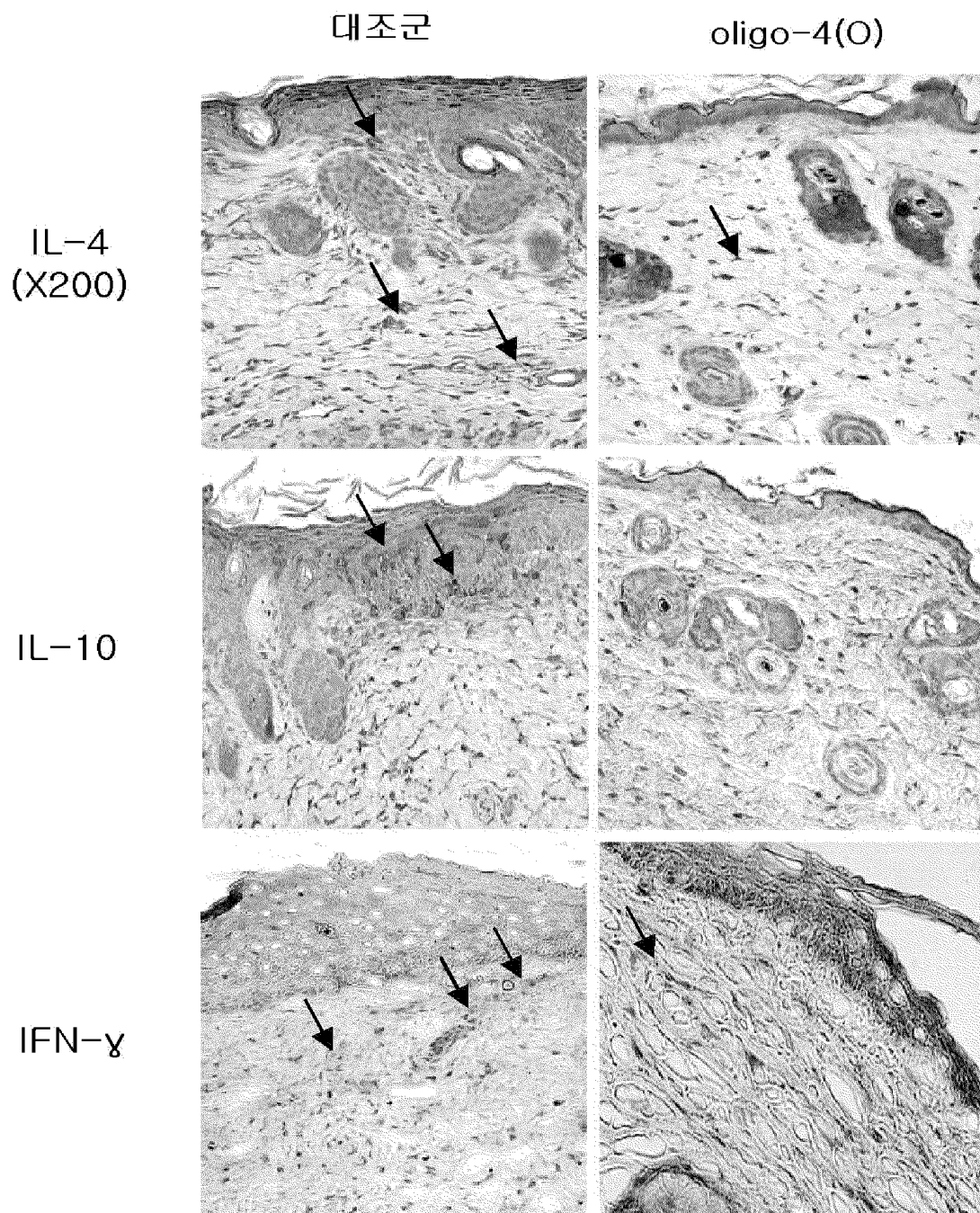
A



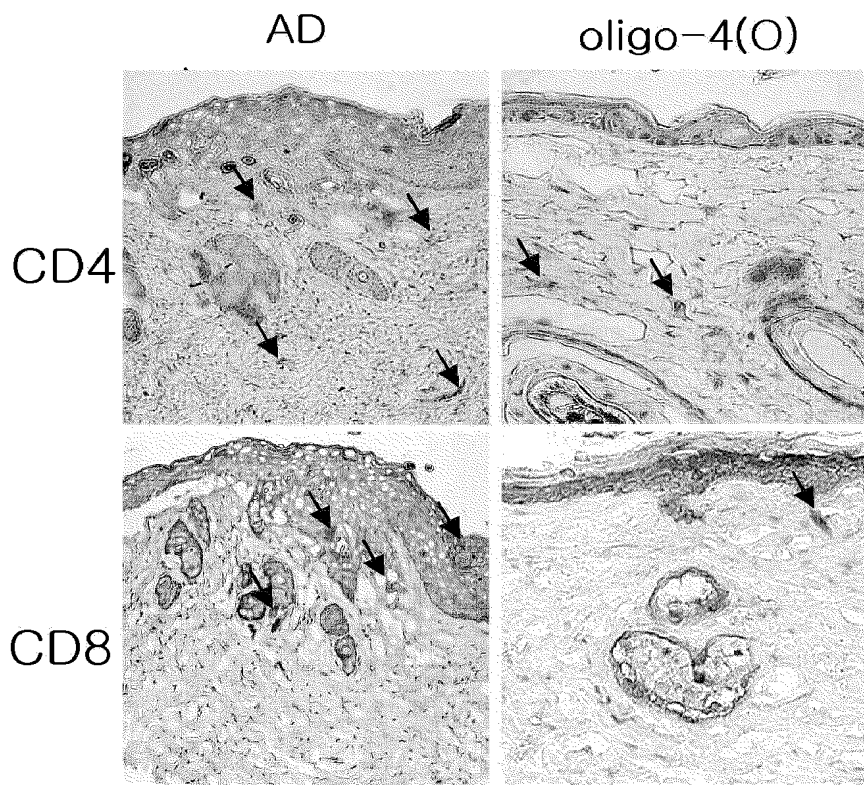
B



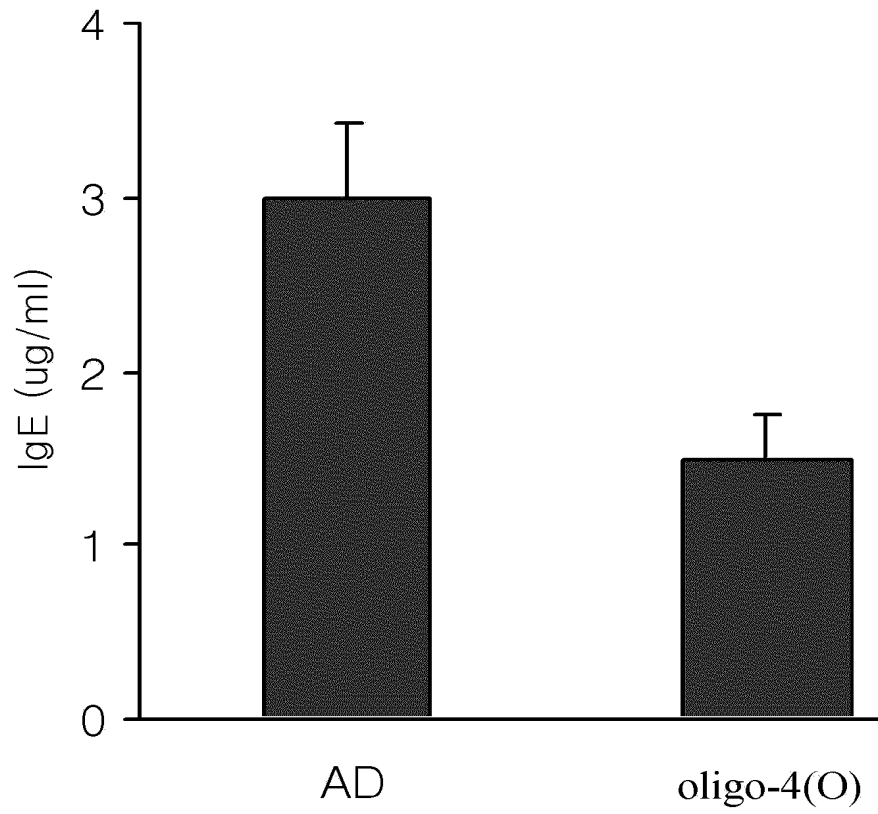
【도 12】



【도 13】



【도 14】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

=

【서열 목록】

<110> KIM, Doo-Sik
 KWON, Hyung-Joo
 KIM, Tae-Yoon

<120> Pharmaceutical composition for treating or preventing dermatitis
 comprising CpG oligodeoxynucleotide

<130> NP04-0110

<160> 34

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CpG ODN

<400> 1

syysacgtt snyrawmytc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligo-4 CpG ODN

<400> 2

ctcgcacgtt gccgaacttc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligo-4-3 CpG ODN

<400> 3

ctcgcacgtt gctgaacttc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligo-4-4 CpG ODN

<400> 4

ctcgcacgtt gccaaacttc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligo-4-8 CpG ODN

<400> 5
ctcgcacgtt gacgaacttc 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo-4-9 CpG ODN

<400> 6
ctcgcacgtt gtcgaacttc 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo-4-10 CpG ODN

<400> 7
ctcgcacgtt cgcgaacttc 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo-4-11 CpG ODN

<400> 8
gctcgacgtt ggcgatactc 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo-4-1 CpG ODN

<400> 9
ctcgcacatt gccgaacttc 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligo-4-2 CpG ODN

<400> 10
ctcgcacttt gccgaacttc 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligo-4-5 CpG ODN

<400> 11

ctcgcacgaa gccgaacttc

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligo-4-6 CpG ODN

<400> 12

ctcgcacgcc gccgaacttc

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligo-4-7 CpG ODN

<400> 13

ctcgcacggg gccgaacttc

20

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for IL-8 promoter

<400> 14

gtgagatctg aagtgtgatg actcagg

27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for IL-8 promoter

<400> 15

gtgaagcttg aagcttgtgt gctctgc

27

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for IL-12 promoter

<400> 16

catgagctca gcctcccgtc tgacc

25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for IL-12 promoter

<400> 17

ctgggctcga gggagagtcc aatgg

25

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1826 CpG ODN

<400> 18

tccatgacgt tctgacgtt

20

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 2006 CpG ODN

<400> 19

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 2041 ODN(non-CpG ODN)

<400> 20

ctggctctttc tggttttttt ctgg

24

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for TNF-alpha

<400> 21

tctcatcagt tctatggccc

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for TNF-alpha

<400> 22

gggagtagac aaggtacaac

20

<210> 23

<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for MIP-2

<400> 23
tgggtgggat gtagctagtt cc 22

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for MIP-2

<400> 24
agtttgcctt gaccctgaag cc 22

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for IL-1

<400> 25
ttgacggacc ccaaagatg 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> reverse primer for IL-1

<400> 26
 agaaggtgct catgtcctca 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> forward primer for IL-6

<400> 27
 gttctctggg aaatcgtgga 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> reverse primer for IL-6

<400> 28
 tgtactccag gtagctatgg 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> forward primer for IL-10

<400> 29
 atgcaggact ttaagggta 20

<210> 30
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> reverse primer for IL-10

<400> 30
 atttcggaga gaggtagaaa cgaccttt 28

<210> 31
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> forward primer for GM-CSF

<400> 31

atgtggctgc agaatttact tticct 26

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for GM-CSF

<400> 32

tgggcttct catttttggc ctggt 25

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for IL-12

<400> 33

ctggtgcaaa gaaacatgg 19

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for IL-12

<400> 34

tggtttgatg atgtccctga

20